

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
Für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
(Lehrstuhl Bakteriologie)
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Nachweis bakterieller Erreger bei Mukoviszidose

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cordula E. Grzonka

aus
Düsseldorf

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Giese

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Michael Hogardt

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
1.1 Mukoviszidose.....	2
1.1.1 Gendefekt.....	2
1.1.2 Klinisches Krankheitsbild.....	3
1.1.3 Pulmonale Pathophysiologie bei CF	5
1.2 Erregerspektrum der Lungeninfektionen bei Mukoviszidose	8
1.2.1 Bakterielle Erreger.....	11
1.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.2.1.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	11
1.2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.2.1.4 <i>Burkholderia cepacia</i> Komplex.....	14
1.2.1.5 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	15
1.2.2 Virale Erreger	16
1.2.3 Pilze.....	16
1.3 Nachweis bakterieller Erreger mittels Fluoreszenz in situ	
Hybridisierung.....	17
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	22
2.1.1.2 Oligonukleotidsonden	23
2.1.2 Arbeitslösungen.....	24
2.1.2.1 Nährmedien	24
2.1.2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer.....	24
2.1.2.3 Gebrauchslösungen zur FISH.....	25
2.1.2.4 Gebrauchslösungen für modifizierte FISH	26
2.1.3 Geräte	26
2.1.4 Probenmaterialien	27
2.1.4.1 Sputumproben	27
2.1.4.2 Kontrollstämme.....	27

2.2 Methoden	28
2.2.1 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	28
2.2.1.1 Probenvorbereitung und Fixierung	28
2.2.1.2 Standard-FISH	28
2.2.1.3 Modifizierte FISH	30
2.2.1.3.1 ‚Blocking‘ unspezifischer Bindungen der Oligonukleotidsonde	30
2.2.1.3.2 Fluoreszenzlöschung	31
2.2.1.4 FISH in Flüssigmedium zur Auswertung mittels Durchflusszytometrie	32
2.2.1.5 DNS-Färbung mit DAPI	32
2.2.1.6 Indirekte Fluoreszenzmarkierung mit Biotin/Streptavidin	32
2.2.2 Auswertung der hybridisierten Proben	33
2.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie	33
2.2.2.2 Durchflußzytometrie	34
2.2.2.3 Fluoreszenzmessung im Spektrometer (Fluorimeter)	36
2.2.3 Einfluss von Lagerungsbedingungen und Antibiotikabehandlung auf FISH	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Validität der Analysedaten der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	39
3.1.1 Reproduzierbarkeit der Erregermengen bei verlängerter Lagerung von Sputum	39
3.1.1.1 Lagerung bei Raumtemperatur	40
3.1.1.2 Lagerung bei 4°C	42
3.1.2 FISH nach Vorbehandlung mit Ciprofloxacin	44
3.2 Reduktion der Hintergrundfluoreszenz bei der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) von CF-Sputum	46
3.2.1 Ursachen der Hintergrundfluoreszenz	46
3.2.2 ‚Blocking‘ der unspezifischen Fluoreszenz	48
3.2.2.1 ‚Blocking‘ unspezifischer Bindungsstellen der Oligonukleotide	48
3.2.2.2 ‚Blocking‘ unspezifischer Bindungsstellen der Farbstoffmoleküle	48
3.2.3 Fluoreszenzlöschung zur Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz	50
3.2.3.1 Überprüfung der Spezifität der FISH-Sonden	53
3.3 Quantitativer Erregernachweis in Sputumproben von CF-Patienten mittels FISH-basierter Durchflusszytometrie	57

3.3.1 Quantitativer Nachweis von <i>in vitro</i> kultivierten Mikroorganismen mittels FISH: Anpassung der Standard-FISH	58
3.3.1.1 Quantifizierung von Erregermengen: Vergleich von OT-FISH und Flüssig-FISH	59
3.3.2 Messung von Sputum im Durchflusszytometer	62
3.3.3 Abgrenzung zweier Bakterienpopulationen im Durchflusszytometer	66
4 Diskussion	67
4.1 Molekularbiologische Nachweismethoden in der Bakteriologie.....	68
4.2 Ein verbessertes Protokoll für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung an CF-Sputum.....	70
4.3 Durchflusszytometrie zur Analyse von CF-Sputum.....	72
4.3.1 Anpassung des FISH-Protokolls zur Kombination mit Durchflusszytometrie	74
4.4 Technische Neuerungen zur Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik bei CF.....	76
5 Zusammenfassung	79
6 Anhang	81
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	81
6.2 Literaturverzeichnis	83
6.3 Danksagung.....	104
6.4 Lebenslauf	105

1 Einleitung

1.1 Mukoviszidose

Die Mukoviszidose (synonym: Zystische Fibrose, engl.: *cystic fibrosis*, CF) ist mit einer Inzidenz von 1:1900 bis 1:3700 die häufigste autosomal-rezessiv vererbte und trotz intensiver Forschungen heutzutage immer noch früh letal verlaufende Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung (Gibson *et al.*, 2003). Dem Erkrankungsbild liegt eine oder mehrere Mutationen im Gen des sog. ‚Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator‘ (CFTR) zugrunde. Eine Störung in der Funktion des CFTR, einem membranständigen Chloridionenkanal, manifestiert sich vielgestaltig an diversen Organsystemen des Menschen, wobei vor allem die Beteiligung von Pankreas und Respirationstrakt im Vordergrund steht. Lebenslimitierend ist bei CF häufig die fortschreitende Einschränkung der Lungenfunktion infolge einer chronisch bakteriellen Pneumonie mit einem CF-spezifischen Erregerspektrum. Zu diesen typischen bakteriellen Erregern gehören *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* und die verschiedenen Spezies des *Burkholderia cepacia*-Komplexes (BCC). Mit zunehmendem Lebensalter dominiert als Infektionserreger jedoch *Pseudomonas aeruginosa*, weshalb dieses Bakterium bei weitem für die meisten Todesfälle bei CF-Patienten verantwortlich gemacht wird.

Der wichtigste therapeutische Ansatz besteht daher in der Gabe einer wirksamen antibiotischen Therapie, die dem für CF charakteristischen Circulus vitiosus aus pulmonalem Sekretstau, Inflammation und chronischer Infektion und der daraus folgenden progressiven Destruktion von Lungengewebe entgegen wirkt. Eine mikrobiologisch-infektiologische Diagnostik, die schnell und sicher die verantwortlichen und ggf. wechselnden Erreger identifiziert sowie deren Antibiotikaempfindlichkeit bestimmt, ist in der Betreuung von CF-Patienten daher von besonderer Bedeutung.

1.1.1 Gendefekt

Die CF wurde als Krankheitsbild bereits 1936 beschrieben (Fanconi *et al.*, 1936), jedoch erstmals 1938 von der Kinderärztin Dorothy Andersen als eigenständiges klinisches Syndrom erkannt (Andersen, 1938). Der bei CF zugrunde liegende autosomal-rezessive Erbgang konnte 1946 aufgedeckt werden (Andersen and

Hodges, 1946) während der verantwortliche Gendefekt erst etwa 40 Jahre später auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert wurde (Knowlton *et al.*, 1985; Tsui *et al.*, 1985). Die Klonierung des CFTR-Gens gelang 1989 (Kerem *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Dieses ca. 250 kbp große Gen kodiert den aus 1480 Aminosäuren bestehenden, von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) abhängigen CFTR, der in der apikalen Zellmembran eingebaut wird und dort als Chloridionenkanal fungiert. Der CFTR reguliert die intrazelluläre Chloridionenkonzentration und besitzt damit einen entscheidenden Einfluss auf den gesamten transepithelialen Elektrolyt- und Flüssigkeitsaustausch. Der Gendefekt bewirkt eine unzureichende Bildung des CFTR und in der Folge eine Fehlfunktion aller exokrinen Drüsen des Menschen. In Darm, Pankreas und in den Schweißdrüsen spielt CFTR eine Schlüsselrolle in der Sekretion von Elektrolyten und Flüssigkeit, während er im Schweißdrüsengang sowie im Atemwegsepithel v.a. an deren Absorption beteiligt ist. Darüber hinaus werden das Zellvolumen und der pH-Wert der Epithelzellen über diesen Ionenkanal beeinflusst (Sheppard and Welsh, 1999; Zielenski, 2000; Treharne *et al.*, 2006).

Bei CF-Patienten wurden bisher mehr als 1400 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens beschrieben (Lyczak *et al.*, 2002; Cystic Fibrosis Consortium, 2004; <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>), die die Expression und Funktion des zugehörigen Proteins auf verschiedenen Ebenen beeinflussen können (Gallati, 2003). Der weltweit häufigste und am besten charakterisierte Defekt $\Delta F508$ ist für etwa 70% der Erkrankungen verantwortlich und besteht in einer Deletion von Phenylalanin (F) an Position 508, was die Proteinkonformation und damit die weitere CFTR-Prozessierung beeinflusst. Durch den verstärkten Abbau des veränderten CFTR-Proteins in den Proteosomen der Zelle kommt es zu einer drastischen Reduktion von CFTR an der apikalen Zellmembran. Durch Mutationen an anderer Stelle wird u.a. die Stabilität des Proteins verringert (z.B. Q1412X oder 4326delTC Mutation), die Aktivierung (G551D u.a.) oder Leitfähigkeit (R117H u.a.) des Ionenkanals gestört (Zielenski *et al.*, 1995; Zielenski, 2000; Lyczak *et al.*, 2002).

1.1.2 Klinisches Krankheitsbild

Der Verlust der CFTR-Funktion verursacht eine Elektrolyttransportstörung in den Epithelzellen aller exokrinen Organe. Daraus resultiert die Bildung eines hochviskosen, hyperosmolaren Sekrets im oberen und unteren Respirationstrakt, im

Gastrointestinaltrakt, Pankreas und männlichen Urogenitalsystem sowie die pathognomonisch hypertone Schweißsekretion.

Das Ausmaß der Organbeteiligung und damit auch der Schweregrad der klinischen Symptomatik sind im Allgemeinen vom Mutationstyp abhängig. Es sind jedoch auch verschiedene Krankheitsverläufe bei gleicher Mutation beschrieben, so dass weitere Modulationsmechanismen vermutet werden (Bush *et al.*, 2000; Groman *et al.*, 2002 and 2005; Rosenstein, 2002; Gibson *et al.*, 2003). So sind Phänotypen, die die Funktion des Ionenkanals zwar beeinträchtigen, aber nicht komplett ausschalten, mit ausreichender Pankreastätigkeit und insgesamt weniger gastrointestinalen Symptomen assoziiert, was früher als sog. pankreassuffizienter Verlaufstyp bezeichnet wurde.

Meist beinhalten die gastrointestinalen Symptome jedoch eine exokrine Insuffizienz des Pankreas (pankreasinsuffizienter Verlaufstyp). Durch die Retention der Pankreasenzyme infolge Sekretstau und Obstruktion mit der Bildung von Zysten und bindegewebigem Umbau kann es im Verlauf der Erkrankung zur Zerstörung des gesamten Pankreasgewebes kommen. Diese makroskopischen Veränderungen haben der Erkrankung den Namen zystische Fibrose gegeben. Typisches Symptom sind Fettstühle als Zeichen mangelnder Fettresorption (Boucher, 2003). Darüber hinaus führt die Störung des Elektrolyttransportes im Darmepithel zur Dehydratation des Darminhaltes bis hin zur Obstruktion von Dünn- und Dickdarm. Daraus resultiert bei einem Teil der erkrankten Neugeborenen das Auftreten des für CF typischen und diagnostisch wegweisenden Mekoniumileus. Bei Kindern und jungen Erwachsenen wird dieses Bild als distale intestinale Obstruktion bezeichnet. Verstarben die meisten Erkrankten früher frühzeitig an einem Ileus oder infolge von Malnutrition und Gedeihstörung (Pier, 2000), so können die gastrointestinalen Symptome bei CF heute durch die Substitution von Pankreasenzymen und fettlöslichen Vitaminen sowie den Einsatz operativer Massnahmen weitgehend beherrscht werden (Boucher, 2003).

Der Nachweis einer erhöhten Konzentration von Natriumchlorid (NaCl) im Schweiß, bedingt durch die Schädigung im zellulären Rücktransport von Chloridionen (diSant'Agnese *et al.*, 1953), wird auch heute noch diagnostisch genutzt. Dieser sog. Schweißtest, der bei einer Chloridkonzentration von mehr als 60mmol/l positiv bewertet wird, ist ein wichtiger Bestandteil in der Diagnose der CF.

Im oberen Respirationstrakt findet sich häufig eine chronische Sinusitis und bei 25% der Patienten eine operationspflichtige Poliposis nasi. Typische Symptome der Beteiligung des unteren Respirationstraktes sind persistierender Husten und die Förderung eines viskosen Sputums. Das abnorm zähe Bronchialsekret führt zur Obstruktion, Erweiterung und schließlich Hyperplasie der submukösen Drüsenausführungsgänge. Die Einengung oder der Verschluss erst der Bronchioli und später der größeren Bronchien führt zur Minderbelüftung und zur Entstehung von Resorptionsatelektasen. Diese morphologischen Veränderungen begünstigen die Kolonisation der Lunge mit Mikroorganismen (s. Kap. 1.2). Mit zunehmender Krankheitsdauer kommt es immer öfter zu infektiös bedingten Exazerbationen mit starkem Husten, vermehrtem Auswurf, Gewichtsverlust und einer fortschreitenden Verschlechterung der Lungenfunktion. Im Endstadium ist die Krankheit durch die respiratorische Insuffizienz und das daraus resultierende Cor pulmonale geprägt, die lebenslimitierend sind, wenn nicht eine Lungentransplantation durchgeführt wird (Boucher, 2003).

1.1.3 Pulmonale Pathophysiologie bei CF

Die chronisch verlaufende Lungenerkrankung ist heutzutage die Hauptursache für Morbidität und Mortalität unter CF-Patienten. Dabei kann man zwischen der Veränderung des Milieus durch die gestörte Funktion des Ionenkanals und der Schädigung des Gewebes durch rekurrende Infektionen unterscheiden. Verschiedene Hypothesen zur Pathophysiologie der CF und besonders dem Beginn der Lungenentzündung werden diskutiert.

Die Lunge von Neugeborenen mit CF ist anfangs in der Regel keimfrei und anatomisch unauffällig (Dinwiddie, 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Gewebe bereits eine intrinsische Entzündungsneigung zeigt. In Bronchialepithelzellen von Gesunden ist das antiinflammatorische Zytokin IL-10 nachweisbar, nicht aber die proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8. CF-Epithelzellen dagegen sezernieren IL-6 und IL-8, aber kein IL-10 (Bonfield *et al.*, 1995).

Das Tracheobronchialsekret bei Gesunden besteht zu etwa 95% aus Wasser und 5% aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Aminosäuren, Elektrolyten und aus Entzündungszellen freigesetzten Desoxyribonukleinsäuren (DNS) (Houtmeyers *et al.*, 1999). Die Muzine, langkettige und durch Disulfidbrücken verbundene Glykoproteine,

sind primär für die physikalischen Eigenschaften des Sekrets, also v.a. für den Grad seiner Viskosität und Elastizität verantwortlich (Rubin 2007). Gesunde Atemwege sind mit einer zweilagigen Mukusschicht ausgekleidet, die Teil des intrinsischen Immunsystems ist. Die untere Schicht mit geringerer Viskosität und höherer Elastizität (Sol-Phase) umhüllt die Zilien der Bronchialepithelzellen. Darüber liegt die viskosere Schicht, auch Gel-Phase genannt, in der inhalierte Fremdkörper aufgefangen und durch den koordinierten Zilienschlag oralwärts transportiert werden. Diesen Prozess bezeichnet man als mukoziliäre Clearance (Houtmeyers *et al.*, 1999; Medici *et al.*, 2001; Sriramulu *et al.*, 2005; s. Abb. 1.1).

Des Weiteren zählen verschiedene antimikrobielle Substanzen zur unspezifischen Abwehr. Lysozyme schädigen die bakterielle Zellwand. Laktoferrin, ein Eisenchelator, konkurriert mit anderen Mikroorganismen um dieses lebenswichtige Spurenelement. Proteasen, Komplementfaktoren und sekretorisches IgA halten die Lunge steril (Hart and Winstanley, 2002). Erst kürzlich wurden zwei Arten von kationischen antimikrobiellen Peptiden entdeckt, die Defensine und Cathelicidin. Sie entfalten eine bakterizide Wirkung durch die Permeabilisierung der bakteriellen Membranen (Singh *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 1999).

CF-Patienten produzieren pro Tag mehrere hundert ml eines sehr viskosen und adhäsiven Tracheobronchialsekretes mit erniedrigtem Natrium- und Chloridionengehalt, das schwer zu expektorieren ist.

Die älteste pathophysiologische Hypothese zur CF führt diese ungewöhnlich zähflüssigen Sekrete auf die Fehlfunktion des CFTR und die dadurch verringerte Sekretion von Salz und Wasser in den submukösen Drüsen zurück (*abnormal gland secretion*’-Hypothese; Engelhardt *et al.*, 1992). Submuköse Drüsen kommen in der menschlichen Lunge allerdings nur in den großen Bronchien und nicht in den Bronchiolen vor.

Die *low volume*’-Hypothese geht davon aus, dass die mechanische Reinigung der Atemwege von Mukus die wichtigste körpereigene Abwehr gegen inhalierte Bakterien darstellt. Infolge der Fehlfunktion des CFTR kommt es durch mehrere Faktoren zu einer Volumenverringerung des Flüssigkeitsfilms (engl.: *airway surface liquid*, ASL), der das Epithel bekleidet. Die aktive Sekretion von Cl⁻-Ionen aus der Zelle, die zu einem passiven Nachstrom von Wasser und somit zu einer Volumenzunahme des ASL führen würde, findet nicht statt. Außerdem wird die Aufnahme von Natriumionen in die Zelle durch den epithelialen Natriumkanal ENaC nicht mehr inhibiert. Die

dadurch in der Zelle stark erhöhte Konzentration an Elektrolyten führt zu einem passiven Einstrom von Wasser durch die Zellmembran, die zwar für Wasser, aber nicht für große Moleküle permeabel ist. Dadurch werden Muzine und Proteine in der ASL stark konzentriert. Dies zieht eine Veränderung der rheologischen Eigenschaften nach sich, wodurch die mukoziliäre Clearance behindert und der Abtransport von Fremdkörpern aus der Lunge erschwert wird (Tomkiewicz *et al.*, 1993; Knowles and Boucher, 2002; Gibson *et al.*, 2003; Rubenstein, 2005; s. Abb. 1.1)

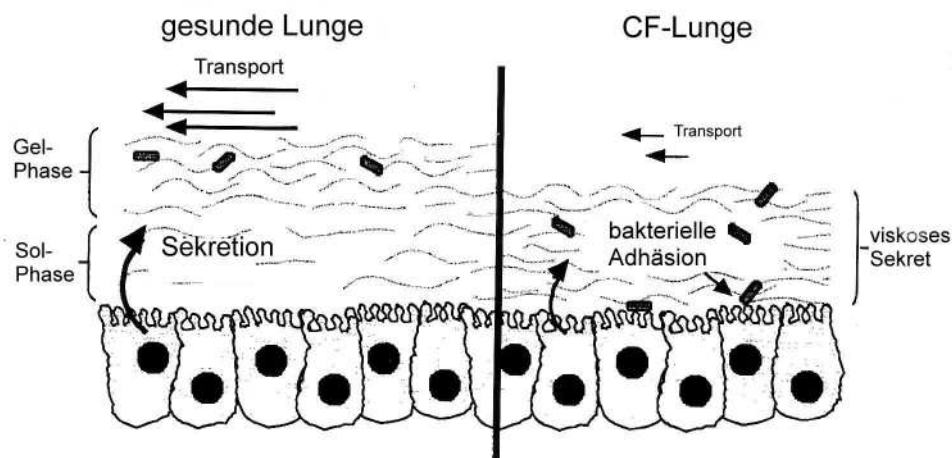


Abb. 1.1: Mukoziliäre Clearance in der gesunden und der CF-Lunge im Vergleich. In gesunden Atemwegen werden Fremdkörper in der Gel-Phase aufgefangen und durch koordinierten Zilienschlag oralwärts transportiert. In der CF-Lunge findet sich dagegen ein viskoses Sekret, das diesen Transportmechanismus stört. Dies begünstigt die Adhäsion von Bakterien an Muzine und Epithelzellen und bedingt eine erhöhte Bakterienmenge in der Lunge (modifiziert nach Lyczac *et al.*, 2002).

Die ‚CFTR-Rezeptor‘-Hypothese vertritt die Interaktion von *Pseudomonas aeruginosa*-Lipopolysaccharid und CFTR-Protein, die in gesunden Zellen die Adhäsion speziell von *P. aeruginosa* an Atemwegsepithelzellen bewirkt und so die Internalisierung und Elimination dieses Erregers durch die Zelle fördert (Pier *et al.*, 1997; Coleman *et al.*, 2003). Die intrazelluläre Retention des unfertigen CFTR-Proteins bewirkt hingegen eine vermehrte Sialisierung von Glykolipiden auf den Membranen einer Epithelzellkultur (Bryan *et al.*, 1998). Dies führt zu einer erhöhten Anzahl der asialo-GM₁-Rezeptoren, was die Pilus-vermittelte Anheftung von *P. aeruginosa* verstärkt, jedoch keinen Transport des Erregers in die Zelle bewirkt (Zar *et al.*, 1995). Der Verlust des funktionsfähigen CFTR soll somit in einer erhöhten Bakterienlast in den Atemwegen resultieren (Imundo *et al.*, 1995; Pier *et al.*, 1997). Beide Modelle konnten zwar *in vitro*, nicht aber *in vivo* beobachtet werden

(Worlitzsch *et al.*, 2006). Weiterhin wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* vornehmlich an den Mukus der ASL, nicht aber das Epithel adhäriert (Worlitzsch *et al.*, 2002), weswegen die ‚CFTR-Rezeptor‘-Hypothese kontrovers diskutiert wird.

Als Reaktion auf die verstärkte bakterielle Besiedelung der Lunge enthält CF-Sputum sehr viele neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie große Mengen an Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukine, v.a. IL-8. Die aktivierten neutrophilen Granulozyten sezernieren Myeloperoxidase und reaktive Sauerstoffmetabolite, die die eingedrungenen Mikroorganismen angreifen (sog. ‚oxidative Burst‘). Durch die große Menge an Leukozyten-Elastase ist das intrinsische Antiprotease-System jedoch überfordert, so dass das Lungengewebe selbst angegriffen und dauerhaft geschädigt wird (Goldstein, 1986; Birrer, 1994).

Absterbende Entzündungszellen geben ihre DNS in die Umgebung ab und dieser stark erhöhte DNS-Gehalt erhöht die Viskosität des Sputums (Griese *et al.*, 1997). Andererseits enthält CF-Sputum weniger Muzine als gesunde ASL, was die rheologischen Eigenschaften verändert und die Kolonisation der Atemwege mit gram-negativen Bakterien sowie die Entwicklung von Biofilmen (s. Kapitel 1.2.1.3) begünstigt (Henke *et al.*, 2004; Rubin, 2007).

Therapeutisch wird u.a. versucht, die Sekrete in der Lunge zu mobilisieren und die Infektionen durch den Einsatz von Antibiotika zu beherrschen. Zur Entfernung der pulmonalen Sekretretention werden v.a. physiotherapeutische Maßnahmen wie Atemübungen und Klopfmassagen eingesetzt. Inhalationen mit hypertoner Salzlösung (Konzentration 3-7%) und rekombinanter humaner DNase (rhDNase), die die konzentrierte DNS abbaut und damit die Sputumviskosität verringert, sorgen für eine bessere Clearance der Sekrete (Griese *et al.*, 1997).

Aufgrund einer verbesserten medizinischen Versorgung hat sich die Lebenserwartung der CF-Patienten von durchschnittlich sieben Jahren in den frühen 1960er Jahren bis auf über 35 Jahre im Jahr 2005 erhöht (Ramsey, 1996; Willis *et al.*, 2001; CF Foundation Annual Patient Registry Data Report, 2005).

1.2 Erregerspektrum der Lungeninfektionen bei Mukoviszidose

Bei Gesunden sind die oberen Atemwege von verschiedenen Mikroorganismen besiedelt, die die sog. normale Flora darstellen. Die unteren Atemwege werden dagegen durch die bereits angeführten Abwehrmechanismen keimfrei gehalten.

Die Lunge von CF-Patienten dagegen bietet einen speziellen Lebensraum für mikrobielle Erreger. Die intrinsische Abwehr ist nicht voll funktionstüchtig und es sind viele organische Substanzen vorhanden, die als Nährboden für Bakterien dienen. Andererseits müssen die Organismen sich der Limitierung bestimmter Wachstumsfaktoren, Dehydratation, leukozytären Angriffen und der Heterogenität des erkrankten Lungengewebes anpassen (Hoiby, 1977; Oliver *et al.*, 2000).

Bemerkenswert ist, dass das Erregerspektrum bei CF-Erkrankten vergleichsweise eingeschränkt ist (Govan and Deretic, 1996) und dass der bakterielle Befall einem bestimmten altersabhängigen Verlauf folgt (s. Abb. 1.2). Zur Diagnostik werden bei Säuglingen und Kleinkindern, die noch nicht zur Expektoration fähig sind, Rachenabstriche verwendet. Dabei wird hauptsächlich *Staphylococcus aureus* nachgewiesen, *Haemophilus influenzae* und *P. aeruginosa* sind die beiden anderen wichtigen Erreger. Gelegentlich auftretende *Staphylococcus pneumoniae* und Enterobakteriaceen spielen dagegen eine untergeordnete Rolle. Es ist noch nicht eindeutig erwiesen, ob von der Besiedelung der oberen Luftwege auf einen Befall der Lunge geschlossen werden kann (Armstrong *et al.*, 1996; Ramsey, 1996; Rosenfeld *et al.*, 1999). Da diese Gefahr jedoch besteht, ist es klinischer Konsens, antibiotisch gegen diese Erreger vorzugehen. (Lyczak *et al.*, 2002)

Bereits im Alter von durchschnittlich 10 Jahren übersteigt die Prävalenz von *P. aeruginosa* die Häufigkeit von *S. aureus*. Neuere, mit Selektivmedien durchgeführte bakteriologische Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch erwachsene CF-Patienten noch Kolonisationsraten von bis zu 50% für *S. aureus* aufweisen (Burns *et al.*, 1998). *P. aeruginosa* ist der Leitkeim des Erwachsenenalters, denn mit 20 Jahren sind über 90% der CF-Patienten besiedelt (s. Abb. 1.2; Fitzsimmons, 1993; Aebi *et al.*, 2001). In dieser Altersgruppe lassen sich außerdem Vertreter des BCC, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* und gelegentlich auch *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus* spp. und *Serratia* spp. nachweisen. Seit den 1990er Jahren werden zunehmend nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) im Sputum von CF-Patienten nachgewiesen mit *Mycobacterium avium* Komplex und *Mycobacterium abscessus* als häufigste Vertreter. Dabei zeigen sich eine deutliche Zunahme der Infektionsrate mit dem Alter, eine positive Korrelation mit *S. aureus* Besiedelung sowie geographische Variationen der Prävalenz zwischen 8%-22%, jedoch keine deutliche Verschlechterung der

Lungenfunktion (Olivier *et al.*, 2003a; Olivier *et al.*, 2003b; Pierre-Audigier *et al.*, 2005).

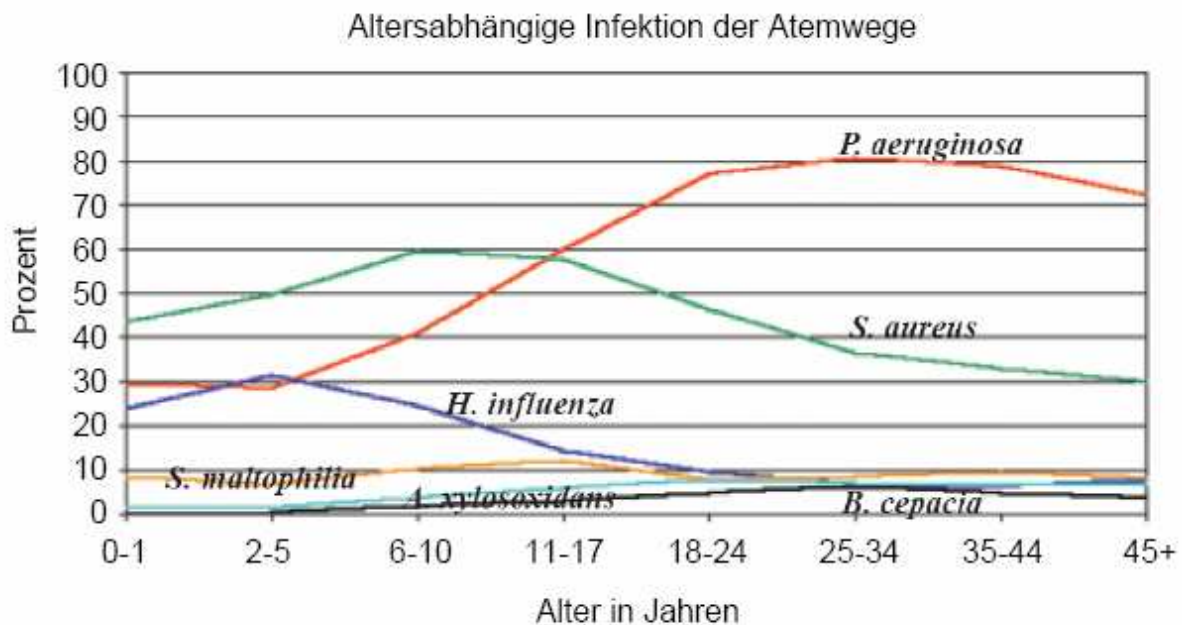


Abb. 1.2: Altersabhängige Prävalenz CF-typischer Erreger (aus *Cystic Fibrosis Foundation Patients Registry* 2002. Annual data report 2003)

Bei akuten Exazerbationen der CF-Lungenerkrankung, aber auch im Rahmen regelmäßiger Vorstellungen der Patienten werden Sputum bzw. Rachenabstriche mikrobiologisch untersucht. Der Goldstandard ist dabei die Kultur (Stender *et al.*, 2002). Die bakteriellen Infektionserreger werden meist auf festen Nährmedien angezüchtet, biochemisch identifiziert und auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika getestet. Dieser Vorgang nimmt oft mehrere Tage in Anspruch, da die Anzucht und Identifizierung einzelner CF-Erreger, etwa aus Mischkulturen, i.d.R. aufwändigere Verfahren wie den Einsatz von Selektivnährmedien erfordert (Hogardt *et al.*, 2006a). Durch das CF-typische langsame Wachstum einzelner Stämme (z. B. BCC, mukoide *P. aeruginosa*-Stämme, ‚small colony variants‘) kann die Diagnostik weiter verzögert werden. Zur Behandlung der akuten Symptomatik und um die Lungenparenchymschädigung dauerhaft möglichst gering zu halten, ist es jedoch wünschenswert, frühzeitig mit einer gezielten erregerspezifischen antibiotischen Therapie zu beginnen.

Um den Verlauf der Therapie zu bewerten, ist eine Quantifizierung der Erreger von Nutzen, typischerweise in koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Gramm Sputum.

Eine Verringerung der Keimzahl, oft um zwei bis drei Zehnerpotenzen, zeigt den Erfolg der Behandlung an (Bauernfeind *et al.*, 1987; Gaillard *et al.*, 1995).

1.2.1 Bakterielle Erreger

1.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Bei *S. aureus* handelt es sich um grampositive, koagulasepositive Kokken, die 30–50% der Gesamtbevölkerung, 10-20% davon permanent, kolonisieren. Als Krankheitserreger verursacht *S. aureus* Abszesse, Sinusitiden, Otitis media, Osteomyelitiden, Wundinfektionen, Sepsis und viele andere Krankheitsbilder (Kayser *et al.*, 1998).

S. aureus ist in der ersten Lebensdekade der am häufigsten nachgewiesene bakterielle Erreger bei CF-Patienten. Die Kolonisation des unteren Respirationstrakt durch diesen Keim wird erleichtert durch die vorliegende Störung der mukoziliären Clearance (s. Kap. 1.1.3) sowie durch virale Schädigung des Epithels, wodurch die Adhärenz von *S. aureus* an virusinfizierte Zellen erhöht wird. Des weiteren exprimiert der Erreger Oberflächenproteine mit Bindungsaktivität für humane Muzine des Bronchialtraktes, die präferenziell an Muzine der CF-Lunge adhären (Trivier *et al.*, 1997; Ulrich *et al.*, 1998). Die Gewebeschädigung erfolgt zum einen über die Ausschüttung von Zytotoxinen wie z.B. Proteasen, Lipasen, Koagulase und Leukocidin, zum anderen entwickelt sich eine proinflammatorische Wirkung durch die Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Komplement (Aebi *et al.*, 2001).

In der vorantibiotischen Ära galt er als die häufigste infektiöse Todesursache im Säuglings- und Kindesalter bei CF (Aebi *et al.*, 2001). Durch die heute verfügbaren Therapiemöglichkeiten lassen sich diese Infektionen kontrollieren, so dass nun *P. aeruginosa* als dominanter Keim und Todesursache im Vordergrund steht.

1.2.1.2 *Haemophilus influenzae*

H. influenzae erscheint mikroskopisch als kleines, unbewegliches gramnegatives Stäbchen. Dieser Keim ist in seiner unbekapselten Form bei 30-50% der Gesunden Bestandteil der normalen Rachenflora. Die virulenten, i.d.R. bekapselten *H. influenzae*-Stämme sind bei Kleinkindern verantwortlich für Meningitis, Epiglottitis,

Pneumonie u.a., beim Erwachsenen verursachen sie bei herabgesetzter Immunkompetenz v.a. Bronchitiden und Pneumonien (Kayser *et al.*, 1998).

Bei jungen CF-Patienten finden sich im Rachenabstrich v.a. unbekapselte *H. influenzae*-Stämme, deren pathogenetische Bedeutung nicht eindeutig belegt ist. Um der Gefahr einer Lungenbesiedelung vorzubeugen, besteht jedoch die Empfehlung, antibiotisch gegen diesen Erreger vorzugehen. (Lyczak *et al.*, 2002)

1.2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei *P. aeruginosa* handelt es sich um plumpe, gramnegative Stäbchen, die eine bis mehrere polare Geißeln besitzen. Er ist ein ubiquitär vorkommender Erreger, der sich v.a. in feuchtem Milieu vermehrt. Für immunkompetente Individuen stellt *P. aeruginosa* normalerweise keine Gefahr dar, ist jedoch ein typischer Erreger nosokomialer Infektionen (Kayser *et al.*, 1998).

Infektionsquellen für CF-Patienten sind bei entsprechendem Hygienemanagement weniger bereits besiedelte Patienten als die unbelebte Umwelt innerhalb oder außerhalb des Krankenhauses (Speert and Campbell, 1987; Grotheus *et al.*, 1988). Unbestritten ist, dass *P. aeruginosa* das infizierte Lungengewebe durch ein Arsenal an Virulenzfaktoren, darunter Proteasen (Elastase, alkalische Protease), Lipase, Phospholipase, Hämolyse und verschiedene Zytotoxine wie Exotoxin A, Exotoxin S oder Exotoxin U schädigt (Hart and Winstanley, 2002).

Im Allgemeinen werden zwei Phasen der Infektion unterschieden. Anfangs wird *P. aeruginosa* bei CF-Patienten nur sporadisch nachgewiesen, was im Normalfall keine Verschlechterung der Lungenfunktion verursacht (Kerem *et al.*, 1990). Diese Phase kann unterschiedlich lang andauern (0 - 5,5 Jahre) (Johansen and Hoiby, 1992). Als chronisch wird die Besiedelung bezeichnet, wenn über den Zeitraum von mindestens 6 Monaten *P. aeruginosa* kontinuierlich in respiratorischen Untersuchungsmaterialien nachgewiesen wird (Johansen and Hoiby, 1992).

Warum gerade *P. aeruginosa* eine so wichtige Rolle bei der meist frühletal verlaufenden CF spielt, ist bis heute noch immer nicht eindeutig geklärt und daher Gegenstand zahlreicher Forschungen. Die chronische Besiedelung geht immer mit einer progressiven Verschlechterung der Lungenfunktion einher, eine Beobachtung, die beim Befall mit den meisten anderen Erregern nicht gemacht wird (Pier, 2000).

Die CF-Lunge stellt einen sehr speziellen Lebensraum dar. Zwar sind aufgrund des gestörten Abtransports von Mukus genügend Nährstoffe für das Wachstum von

Bakterien vorhanden, andererseits müssen diese jedoch gegen die Dehydrierung, zelluläre Abwehr, die Heterogenität des zerstörten Lungengewebes und die sich regelmäßig wiederholenden Antibiotikatherapien bestehen. Die Adaptation von *P. aeruginosa* zeigt sich in der phänotypischen Vielfalt chronischer CF-Isolate (Hogardt *et al.*, 2006c). Unter den wechselhaften Bedingungen der CF-Lunge haben solche Stämme einen Selektionsvorteil, die sich durch häufige Mutationen schnell den wechselnden Konditionen anpassen können. So wurden in CF-Lungen gehäuft Stämme mit hohen Mutationsraten, sog. Mutatoren nachgewiesen (Oliver *et al.*, 2000, Hogardt *et al.*, 2006c). Die Hypermotabilität von *P. aeruginosa* geht u.a. mit höheren Resistenzraten gegen Antibiotika einher. In einer Studie war diese bei Mutator-Stämmen beispielsweise etwa doppelt so hoch wie bei Non-Mutator-Stämmen (Oliver *et al.*, 2000).

Ein CF-typischer Morphotyp von *P. aeruginosa* sind mukoiden Isolate. Als mukoid beschreibt man Stämme, die in großen Mengen ein Polysaccharid produzieren, das als Alginat oder mukoides Exopolysaccharid (MEP) bezeichnet wird. Dieser Phänotyp wird kaum in anderen Lebensräumen beobachtet (Davies and Geesey, 1995). Die Produktion von Alginat wird u.a. durch Anaerobiose, Sauerstoffradikale, Stickstoff- oder Phosphatlimitierung induziert und bewirkt eine erhebliche Steigerung der Virulenz (Terry *et al.*, 1991; Mathee *et al.*, 1999; Worlitzsch *et al.*, 2006). Unter dem Schutz von Alginat erhöht sich die Resistenz gegenüber Angriffen durch neutrophile Granulozyten und Antibiotika (Costerton, 2001; Pier *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2005). Ein weiteres Phänomen ist die Bildung von Biofilmen. Biofilme sind bakterielle Mikrokolonien, die in eine extrazelluläre Matrix (z.B. Alginat) eingebettet sind. Sie entstehen, wenn Bakterien in großer Dichte wachsen und dabei Stoffe sezernieren, die zu einer koordinierten Bildung von Alginat und Virulenzfaktoren führen, ein Prozess, der auch als ‚*Quorum Sensing*‘ bezeichnet wird (Hart and Winstanley, 2002; Yoon *et al.*, 2002).

Diese Biofilme des fakultativ anaeroben Organismus *P. aeruginosa* finden sich speziell in der Mukusschicht über dem Lungenepithel. Dort kommt es durch den vermehrten Sauerstoffbedarf der CF-Epithelzellen zu abnehmendem Sauerstoffpartialdruck und damit der Induktion von Alginatproduktion und Bildung von Makrokolonien (Stutts *et al.*, 1986; Worlitzsch *et al.*, 2002; Worlitzsch *et al.*, 2006). Durch die ungenügende mukoziliäre Clearance in der CF-Lunge können sich so chronische Infektionen etablieren.

1.2.1.4 Burkholderia cepacia Komplex

Burkholderia spp. sind gramnegative, begeißelte Stäbchen. Die Gattung *Burkholderia* wurde erst 1992 aus dem Genus *Pseudomonas* ausgegliedert, da durch die rRNS-DNS-Hybridisierung gravierende genetische Unterschiede nachgewiesen wurden (Yabuuchi *et al.*, 1992). Die ursprünglich als *Pseudomonas cepacia*, später als *Burkholderia cepacia*, bezeichnete Art wurde 1950 als Erreger der Zwiebfäule identifiziert (Burkholder, 1950; Ballard *et al.*, 1970). Es stellte sich jedoch heraus, dass diese phänotypisch identischen Organismen genotypische Unterschiede aufwiesen, so dass diese Spezies im *Burkholderia cepacia*-Komplex (BCC) zusammengefasst wurden (Vandamme *et al.*, 1997; Mahenthiralingam *et al.*, 2000). Der BCC umfasst inzwischen zehn verschiedene *Burkholderia*-Spezies (ehemals Genomovare) (Brown and Govan, 2007), zusätzlich wurden noch 13 non-BCC *Burkholderia*-Spezies beschrieben (Coenye *et al.*, 2001). Bei CF-Patienten werden am häufigsten *B. multivorans* (Genomovar II) und *B. cenocepacia* (Genomovar III) isoliert (LiPuma *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004; Reik *et al.*, 2005).

In den 1980er Jahren wurde zum ersten Mal von Infektionen mit BCC bei CF-Patienten berichtet, die epidemisch in einigen CF-Zentren ausbrachen und eine hohe Mortalität mit sich brachten. Einige Stämme, wie etwa der *B. cenocepacia* Stamm ET12, sind hochinfektiös und werden durch Aerosole von Mensch zu Mensch (Tröpfcheninfektion) oder aber durch den gemeinsamen Gebrauch medizinischer Geräte wie etwa Spirometer übertragen (Govan *et al.*, 1996; Ledson *et al.*, 1998; Mahenthiralingam *et al.* 2001). Dabei kann das klinische Bild einer Infektion stark variieren, von jahrelanger Persistenz der Erreger mit sich langsam verschlechternder Lungenfunktion bis zum fulminanten sog. ‚Cepacia-Syndrom‘ mit nekrotisierender Pneumonie und Bakteriämie (LiPuma *et al.*, 1990; Ledson *et al.*, 1998).

BCC-Isolate besitzen eine primäre Resistenz gegen die antimikrobiellen Peptide des Lungensekrets (Baird *et al.*, 1999) und die Fähigkeit, die im Rahmen des oxidativen Burst von Leukozyten sezernierten Sauerstoffradikale zu neutralisieren (Zughaier *et al.*, 1999; Smalley *et al.*, 2001).

Eine weit gefächerte intrinsische Antibiotikaresistenz ist charakteristisch für BCC, besonders für CF-Isolate. Dieses beruht auf verschiedenen Mechanismen wie z.B. der Produktion von β -Lactamase, der Unfähigkeit des Medikaments an die äußere

Membran des Organismus zu binden, sowie dem aktiven Transport von Antibiotika aus der Zelle mittels membranständiger Pumpen (Nair *et al.*, 2004).

BCC produziert zudem eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, wie Protease, Lipase, Hämolyse und Zytotoxine. Daher überrascht es nicht, dass die chronische Besiedelung mit BCC die Prognose der Patienten signifikant verschlechtert (Frangolias *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2004). Im Rahmen des Cepacia-Syndroms zeigt der Organismus ein aggressiv-invasives Verhalten, indem er die Epithelgrenze durchbricht und in Parenchym und Blutgefäße eindringt. Besonders hohe Erregerzahlen finden sich in nekrotisierten Gewebsabschnitten und perivaskulären Bereichen, auch kann BCC in Makrophagen persistieren (Sajjan *et al.*, 2001)

1.2.1.5 *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia ist ein nicht fermentierendes, gramnegatives Stäbchen. Anfänglich dem Genus *Pseudomonas* zugerechnet, wurde es 1983 in die Gattung *Xanthomonas* ausgegliedert, bis schließlich nach weiterer taxonomischer Analyse 1993 das Genus *Stenotrophomonas* begründet wurde (Palleroni and Bradbury, 1993). Es tritt ubiquitär und vornehmlich in feuchter Umgebung sowie in Böden auf und besiedelt vor allem Waschbecken und Wasserleitungen, sowie im Krankenhaus z.B. Vernebler und Beatmungsmaschinen (Denton *et al.*, 1998; Denton, 2001). Wie auch *P. aeruginosa* und die Arten des BCC tritt es als nosokomialer Krankheitserreger bei immunkomprimierten Patienten in Erscheinung. Typische Krankheitsbilder umfassen Infektionen der Atemwege, besonders bei beatmeten Patienten, und bakterielle Sepsis sowie die Besiedelung von Kathetern, Prothesen und anderen medizinischen Fremdkörpern (Kerr *et al.*, 1994; Laing *et al.*, 1995; Denton, 2001). *S. maltophilia* besitzt ebenfalls eine breite intrinsische Antibiotikaresistenz, die infolge der Bildung einer chromosomal-kodierten Metallo- β -Lactamase alle β -Laktamantibiotika bis hin zu den Carbapenemen erfasst.

Die Prävalenz bei CF-Patienten variiert von Land zu Land und Zentrum zu Zentrum zwischen 6% und 30%, was vor allem auf unterschiedliche kulturelle Verfahren zurückgeführt wird (Denton *et al.*, 1998; Graff and Burns, 2002; Goss *et al.*, 2004). *S. maltophilia* ist nach *P. aeruginosa* der zweithäufigste gramnegative Keim in den Atemwegen von CF-Patienten (s. Abb. 1.2; Burns *et al.*, 1998). Die meisten dieser Infektionen treten sporadisch auf, die chronische Besiedelung von Patienten ist selten (Demko *et al.*, 1998; Valdezate *et al.*, 2001; Graff and Burns, 2002). Dabei gibt

es bisher keine Hinweise dafür, dass eine Übertragung von Mensch zu Mensch zwischen CF-Patienten stattfindet (Denton *et al.*, 1998). Als Risikofaktoren für eine Infektion mit *S. maltophilia* wurden geringes Körpergewicht, schlechtere Lungenfunktion, höheres Alter und Langzeit-Antibiotikatherapie, besonders mit oralen Chinolonen, beschrieben (Demko *et al.*, 1998; Goss *et al.*, 2002; Graff and Burns, 2002). Die Besiedelung mit diesem Organismus bringt zwar eine mäßige Verschlechterung der Lungenfunktion (gemessen in FEV₁) mit sich, beeinträchtigt i.d.R. jedoch nicht die Lebenserwartung der Patienten (Karpati *et al.*, 1994; Demko *et al.*, 1998; Goss *et al.*, 2004)

1.2.2 Virale Erreger

Für einige der akuten Exazerbationen – v.a. im Kindesalter – werden respiratorische Viren wie Influenza A und B, Rhino- und Adenoviren, Metapneumovirus und ganz besonders das *Respiratory-Syncytial-Virus* (RSV) verantwortlich gemacht (Prober, 1991).

Der virale Befall ist für den weiteren Krankheitsverlauf bedeutsam, da das so vorgeschädigte Respirationsepithel leichter von Bakterien besiedelt werden kann. So wurde ein Zusammenhang zwischen RSV-Infektionen und der Neuentwicklung einer chronischen *P. aeruginosa*-Infektion beschrieben (Pedersen *et al.*, 1981; Johansen and Hoiby, 1992). Für *H. influenzae* und *S. aureus* wurde eine bessere Adhärenz an durch Viren geschädigte Epithelzellen nachgewiesen (Aebi *et al.*, 2001)

1.2.3 Pilze

Infektionen durch Pilze spielen bei CF aufgrund des intakten Immunsystems der Patienten eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz zu *Candida* spp. werden *Aspergillus* spp. eindeutig mit einer klinischen Symptomatik assoziiert. Bei bis zu 50% der CF-Patienten kann *Aspergillus fumigatus* im Sputum nachgewiesen werden, wobei bis zu 10% der Betroffenen das klinische Bild einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) bieten, das sich in wiederkehrenden Atemwegsobstruktionen und röntgenologisch durch wolkige Verschattungen manifestiert (Greenberger, 1997; Boucher, 2003).

1.3 Nachweis bakterieller Erreger mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Eine zentrale Aufgabe der Mikrobiologie ist die Identifizierung und Differenzierung von Mikroorganismen. Zur Klassifizierung von Bakterien ist es mangels ausreichender morphologischer Unterscheidungsmerkmale grundsätzlich sinnvoll, einen Organismus in Reinkultur zu züchten, um ihn dann durch Bestimmung physiologischer und biochemischer Eigenschaften bis auf Genus- und Speziesebene zu identifizieren (Amann *et al.*, 1995). Dadurch ist es jedoch unmöglich, die Organismen in ihrer natürlichen Lebensgemeinschaft darzustellen. Zudem gibt es Bakterien, die sich unter den bisher üblichen Kultivierungsbedingungen nicht oder nur mit aufwändigeren Methoden anzüchten lassen und daher auf herkömmlichem Wege nicht bestimmt werden können (Wagner *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1995). Es bestand also ein Bedarf an umfassenderen und kulturunabhängigen Methoden.

Schon 1965 erkannten Zuckerkindl und Pauling, dass in Makromolekülen wie Ribonukleinsäuren (RNS) und Proteinen Informationen zur Evolutionsgeschichte dokumentiert sind. Anhand von Mutationen lässt sich daran die Entstehung verschiedener Entwicklungslinien nachvollziehen. (Wilson *et al.*, 1977; Böttger, 1995; Trebesius, 1995). Darauf aufbauend werden Bakterien heutzutage nach ihrer DNS-Zusammensetzung taxonomisch eingeteilt; eine Genospezies wird durch eine DNS-DNS-Ähnlichkeit von mehr als 70% definiert (Wayne *et al.*, 1987; Amann *et al.*, 1995). Derzeit wird eine vergleichende Sequenzanalyse ribosomaler RNS (rRNS) als die leistungsfähigste Methode zur Klassifizierung von Mikroorganismen betrachtet (Murray *et al.*, 1990). rRNS-Moleküle sind bei allen Lebewesen in großer Zahl (10^5 - 10^6 /Bakterienzelle) in jeder einzelnen Zelle vorhanden und besitzen aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion stark konservierte Bereiche sowie eine Vielzahl unabhängig mutierender Nukleotide. Durch diese Eigenschaften eignen sich besonders die größeren 16S und 23S rRNS-Moleküle gut zur Aufstellung eines Klassifikationssystems (Woese, 1987; Ludwig und Schleifer, 1994; Wagner, 1995; Trebesius, 1995).

Ermöglicht wird dieser Ansatz durch die Methode der Nukleinsäurehybridisierung, deren Entwicklung in den 1960er Jahre begann. Seit 1969 war es dabei möglich, Nukleinsäuren an dem Ort ihres natürlichen Vorkommens zu detektieren (John *et al.*, 1969). 1988 gelang zum ersten Mal die Darstellung von einzelnen bakteriellen Zellen durch gegen die rRNS gerichtete, radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden (Giovannoni *et al.*, 1988). Kurz darauf wurde eine solche *in situ* Hybridisierung mit

Fluorochrom-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Fluorochrome besitzen den Vorteil der direkten Visualisierung des hybridisierten Präparates unter dem Fluoreszenzmikroskop (DeLong *et al.*, 1989).

Die Nachweisbarkeit eines Bakteriums hängt dabei von der Anzahl der Ribosomen in der Zelle ab und in begrenztem Rahmen lassen sich durch die Fluoreszenzintensität Aussagen über die Aktivität des Organismus treffen. Viele Ribosomen, wie sie in stoffwechselaktiven Zellen mit einer hohen Teilungsrate zu finden sind, garantieren eine gute Nachweisbarkeit (DeLong *et al.*, 1989; Kramer and Singleton, 1992; Wallner *et al.*, 1993). Es sind jedoch auch Beispiele von langsam wachsenden Bakterien mit hohem Ribosomengehalt oder hoch aktiven Zellen mit geringer Ribosomenzahl beschrieben worden (Wagner *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 2002).

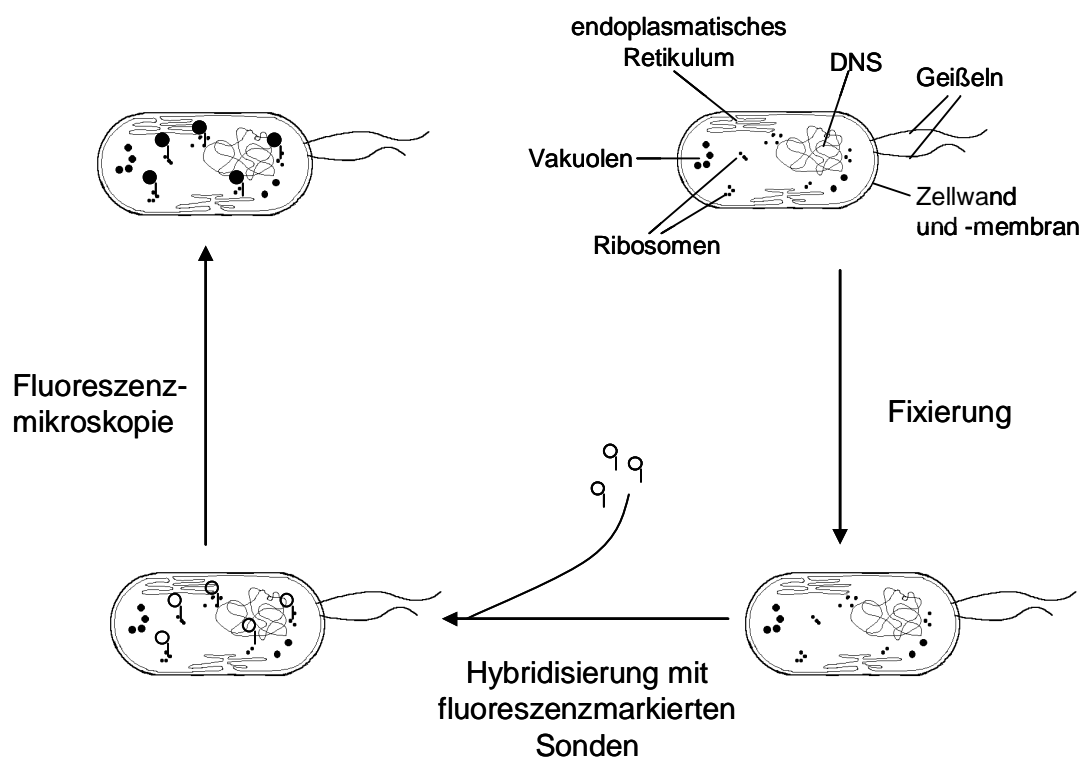


Abb. 1.3: Prinzip des Nachweises von Bakterien mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Die bakterienhaltige Probe wird fixiert und mit fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert. Der Oligonukleotidteil der Sonde bindet spezifisch an homologe Bereiche der bakteriellen rRNA. Bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop absorbiert der Fluorochromanteil der Sonde Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittiert Licht einer längeren Wellenlänge.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH; s. Abb. 1.3) ist als hoch spezifische und verlässliche Methode in der Umweltmikrobiologie fest etabliert. In der medizinischen Mikrobiologie bringt sie wegweisende Veränderungen, da sie den Nachweis von Infektionserregern auf wenige Stunden verkürzen kann.

Dieses ist insbesondere bei lebensbedrohlichen Infektionen von großer Bedeutung, bei denen der frühzeitige Einsatz einer spezifischen (kalkulierten) Antibiotikatherapie entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist.

Die Hybridisierung von positiven Blutkulturen ist daher ein vielversprechendes Anwendungsgebiet der FISH, mit dem sich bereits verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen. Es wurden Oligonukleotidsonden für die häufigsten Erreger der Sepsis entwickelt (z.B. *S. aureus*, *Candida sp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*), sowie ein Protokoll erstellt, um frühzeitig Kontaminationen mit Koagulase-negativen Staphylokokken zu erkennen (Kempf *et al.*, 2000; Fazii *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2005; Kempf *et al.*, 2005; Søgaaard *et al.*, 2005).

Weitere Beispiele für Erkrankungen, die schnelles jedoch gezieltes therapeutisches Eingreifen erfordern, sind die nekrotisierende Faszitis, typischerweise eine Mischinfektion, das von Streptokokken der Gruppe A verursachte *toxic shock* Syndrom (Trebesius *et al.*, 2000) und die bakterielle Meningitis (Fazii *et al.*, 2002; Poppert *et al.*, 2005).

Vorteilhaft ist dabei die hohe Spezifität der FISH, die innerhalb weniger Stunden genaue Informationen über den oder die Erreger gibt, und damit z.B. der Gramfärbung weit überlegen ist. Im Gegensatz zur Kultur kann die FISH außerdem in einem gewissen Zeitraum auch nicht mehr wachstumsfähige Erreger nachweisen, wie sie bei Probenentnahme nach initialisierter Breitband-Antibiotikatherapie oder ungünstigen Lagerungs- oder Transportbedingungen vorliegen (Trebesius *et al.*, 2000; Rüssmann *et al.*, 2001a).

Als schnelle, spezifische und auch relativ kostengünstige Methode eignet sich die FISH zum Screening symptomloser Infektionen, so z. B. zur Erkennung von vaginaler Besiedelung mit Streptokokken der Gruppe B bei Schwangeren, um durch die prophylaktische Antibiotikagabe der Neugeborenenensepsis vorzubeugen (Artz *et al.*, 2003).

Da die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung anders als die Kultur nicht auf das Wachstum der Organismen angewiesen ist, können auch schwer kultivierbare Erreger wie *Chlamydia* in verschiedenen Probenmaterialien (Poppert *et al.*, 2002;

Kapur *et al.*, 2006), Mykobakterien (Stender *et al.*, 1999), Legionellen aus Bronchialbiopsien (Hu *et al.*, 2002) und *Helicobacter pylori* aus Magenbiopsien (Rüssmann *et al.* 2001a) innerhalb kurzer Zeit nachgewiesen werden. Die Resistenz von *H. pylori* gegen Clarithromycin beruht auf Punktmutationen in der 23S rRNA. Zum Nachweis dreier solcher Mutationen sind Oligonukleotidsonden entwickelt worden, mit deren Hilfe die Therapie des Ulcus ventriculi optimiert werden kann (Rüssmann *et al.*, 2001b).

Auch der Nachweis von Infektionserregern im Sputum von CF-Patienten wurde bereits etabliert (Hogardt *et al.*, 2000), wiederum mit dem Ziel, den Patienten eine möglichst erregerspezifische, schnelle Therapie zu ermöglichen. Mit der FISH ist z.B. im Akutfall ein Ausschluss von relevanten Erregern wie *P. aeruginosa* oder BCC bzw. die Differenzierung von Mischinfektionen möglich. Weiterhin wird eine schnelle Erregeridentifizierung auch während einer antibiotischen Behandlung ermöglicht. Durch die Viskosität und die komplexe und inhomogene Zusammensetzung von Sputum, insbesondere des CF-Sputums mit seinem hohen Anteil an freier DNS, steht die FISH besonderen methodischen Problemen gegenüber. Die Hybridisierung von Sputumproben ist daher in den meisten Fällen sehr artefaktreich, was die mikroskopische Auswertung erschwert.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Mukoviszidose ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, deren wichtigster und meist lebenslimitierender Faktor rezidivierende, chronisch verlaufende Lungeninfektionen mit einem CF-typischen Erregerspektrum sind (v. a. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cepacia*-Komplex, *H. influenzae* und *S. maltophilia*). Eine schnelle, sensitive und spezifische Identifizierung dieser Infektionserreger ist notwendig, um eine empirische aber erregerspezifische Antibiotikatherapie ggf. ohne Verzögerung zu beginnen und im weiteren Therapieverlauf zu kontrollieren. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) kann ein spezifischer Erregernachweis innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden. Aufgrund des begrenzten Erregerspektrums bei CF ist der Einsatz weniger genus- oder speziesspezifischer Sonden ausreichend, um die wichtigsten Infektionserreger in einem einzigen Hybridisierungsansatz zu erfassen.

CF-Sputum ist allerdings ein inhomogenes Untersuchungsmaterial, das aufgrund seiner Zusammensetzung bei der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden eine ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz zeigt, was die mikroskopische Auswertung erschwert. Des Weiteren können Proben in der medizinischen Routinediagnostik vor der Verarbeitung unterschiedlich langen Transport- und Lagerungszeiten unter uneinheitlichen Bedingungen ausgesetzt sein. Der Zeitpunkt der Probenfixierung beeinflusst jedoch den Ribosomengehalt der Zellen und kann bei Verzögerung die Sensitivität der Methode einschränken.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob die FISH-Technik zum Nachweis CF-typischer Mikroorganismen als Routinemethode in der Mikrobiologie etabliert werden kann. Dieses sollte erreicht werden, indem die typische Hintergrundfluoreszenz des Sputums reduziert und ein automatisierter Durchflusszytometer-basierter Erregernachweis einschliesslich der Quantifizierung der Erregermengen etabliert wird. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie die Ergebnisse durch unterschiedliche Lagerungsbedingungen bzw. eine bereits initiierte Antibiotikatherapie beeinflusst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Acet-Anhydrid (0,25 v/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Biotin (Vitamin H)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ciprofloxacin	Bayer AG, Leverkusen, D
Citifluor AF1	Citifluor Ltd., London, UK
CyDye™ Fluorescent Dyes (Fluorophore Cy3 und Cy5)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, D
Cystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Dabsyl (4-Dimethylaminoazobenzene- 4'-sulfonyl)chlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, D
Denhardts Lösung (50x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Flow-Count™ Fluorospheres	Coulter Cooperation, Miami, Florida, USA
Fluorescein-Natrium (FLUOS)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, D
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lysostaphin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Streptavidin-PC5	Immunotech, Marseille, F
Tergitol [®] (Sodium-7-ethyl-2-methyl-4-undecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Thymus-DNS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Alle sonstigen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D bezogen.

2.1.1.2 Oligonukleotidsonden

Die Sonden zur FISH bestehen aus einem kurzkettigen Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Biotin markiert wurde.

In dieser Arbeit wurden folgende Sonden verwendet:

Sonde	Zielorganismus	Basensequenz	rRNS	Referenz
BET42a	Beta-Unterklasse von <i>Proteobacteria</i>	5'-GCCTTCCCACTTCGTTT-3'	16S	Manz <i>et al.</i> , 1992
Burcep	<i>B. cepacia</i>	5'-CTGTGCGCCGGTTCTCTT-3'	16S	Hogardt <i>et al.</i> , 2000
EUB338	<i>Eubacteria</i>	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	16S	Amann <i>et al.</i> , 1990
Haeinf	<i>H. influenzae</i>	5'-CCGCACTTTCATCTTCCG-3'	16S	Hogardt <i>et al.</i> , 2000
PsaerA	<i>P. aeruginosa</i>	5'-GGTAACCGTCCCCCTTGC-3'	16S	Trebesius <i>et al.</i> , 2000
PsaerB	<i>P. aeruginosa</i>	5'-TCTCGGCCTTGAAACCCC-3'	23S	Trebesius <i>et al.</i> , 2000
Staur	<i>S. aureus</i>	5'-GAAGCAAGCTTCTCGTCCG-3'	16S	Trebesius <i>et al.</i> , 2000
Stemal	<i>S. maltophilia</i>	5'-GTCGTCCAGTATCCACTGC-3'	16S	Hogardt <i>et al.</i> , 2000

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotidsonden mit Zielorganismus, Basensequenz und Zielstruktur

Zur Markierung wurden die folgenden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet:

Farbstoff	Absorption Max. (nm)	Emission Max. (nm)
Fluorescein (FLUOS)	494	518
Cy3	552	570
PC5	488	670
TAMRA	565	580

Tab. 2.2: Fluoreszenzfarbstoffe mit Absorptions- und Emissionsmaximum

Die fluoreszenzmarkierten Sonden wurden von INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm, D bezogen.

Die Cy3- und TAMRA-markierten Sonden wurden in sterilem Wasser, die FLUOS-markierten Sonden dagegen in Natriumkarbonatpuffer gelöst und anschließend mit 10mM Tris-HCl auf eine Endkonzentration von 50ng/ml verdünnt.

2.1.2 Arbeitslösungen

2.1.2.1 Nährmedien

Luria-Bertani (LB)-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH	7,5
Schokoladen-Agar mit Bacitracin	Becton & Dickinson, Heidelberg, D	
Trypton-Soya-Agar (TSA)-Platten	Becton & Dickinson, Heidelberg, D	
Trypton-Soya-Broth (TSB)-Medium 30g/l	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK	

2.1.2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Natriumkarbonatpuffer	1 Teil NaHCO ₃	1M
	9 Teile Na ₂ CO ₃	1M
	pH	9,0
DAPI-Arbeitslösung	DAPI-Stammlösung (1mg/ml) 1:1000 mit PBS verdünnen	

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	NaCl	130 mM
	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	10 mM
	pH	7,4

2.1.2.3 Gebrauchslösungen zur FISH

Fixierungslösung 4% PFA in 200mM PBS
pH 7,2

Gelatinelösung Gelatine 0,1%
Kaliumchromsulfat 0,01%
in H₂O zum Lösen auf 60°C erhitzen

Hybridisierungspuffer NaCl 0,9M
Tris-HCl 20mM
SDS 0,01%
Formamid 20%

Lysostaphin-Lösung 0,1mg Lysostaphin pro ml
in Tris-HCL (10mM)
pH 8,0

Lysozym-Lösung 2mg Lysozym pro ml
in Tris-HCL (10mM)
pH 8,0

SDS-Lösung 10% SDS in H₂O, sterilfiltriert

Tris-Puffer Tris-HCl 1M
pH 8,0

Waschpuffer NaCl 112mM
Tris-HCl 20mM
SDS 0,01%

2.1.2.4 Gebrauchslösungen für modifizierte FISH

SSC	NaCl	3M
	Na-Zitrat	0,3M
	pH	7,0
1x Denhardts Lösung (50ml)	1ml Denhardts Lösung (50x)	
	5ml SSC (20x)	
	ad 50ml mit H ₂ O	
Acet-Anhydrid-Lösung (50ml)	0,125ml Acet-Anhydrid (0,25% v/v)	
	0,745ml Triethanolamin (0,1M)	
	ad 50ml mit H ₂ O	
Ethanol-Essigsäure-Lösung	3 Teile Ethanol (95%) und 1 Teil Eisessig	
Cy5-Farbstofflösung	Farbstoff in sterilem H ₂ O gelöst, dann mit 10 mM Tris-HCl auf gewünschte Konzentration (s. Kap. 2.2.1.3.1) eingestellt	

2.1.3 Geräte

Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL mit System II TM Software	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM-RBE	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Konfokales Lasermikroskop Leica TCS NT mit Software 1.6.582	Leica, Heerbrugg, CH
Spectrometer Aminco-Bowman® Series 2 mit Software OS/2 4.0	Spectronic Instruments, Rochester, New York, USA

2.1.4 Probenmaterialien

2.1.4.1 Sputumproben

Die mittels FISH untersuchten Sputen wurden von am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München betreuten CF-Patienten gewonnen und zur mikrobiologischen Routinediagnostik an das Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie gesandt.

2.1.4.2 Kontrollstämme

Als Kontrollstämme zur FISH wurden folgende Mikroorganismen verwendet:

Name	Herkunft
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 3391
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 21549
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	DSM 50170

Tab 2.3: Kontrollstämme

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen, Braunschweig, D

2.2 Methoden

2.2.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

2.2.1.1 Probenvorbereitung und Fixierung

Zur leichten Verarbeitung wurden die Sputumproben von CF-Patienten durch Vorbehandlung mit Dithiothreitol homogenisiert (sog. DTT-verflüssigtes Sputum). Hierzu wurden die Sputen mit frisch angesetzter Dithiothreitol-Lösung (1mg/ml) im Verhältnis 1:2 (w/v) versetzt, gevortext und dann wie unten beschrieben fixiert. Die Kontrollstämme (Tabelle 2.3) wurden in LB-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert (OD_{600} 0,5), durch Zentrifugation (6800g) pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und dann fixiert.

Die Probenfixierung gramnegativer Bakterien vor der Hybridisierung erfolgte mittels PFA. Hierzu wurde ein Volumen DTT-verflüssigtes Sputum oder ein Volumen einer Bakteriensuspension (200-400µl) mit 3 Volumen 4% PFA gemischt. Das Gemisch wurde durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und zur Fixierung für mindestens 4h oder über Nacht bei 4°C gelagert. Zur Endfixierung wurden die Proben 5min bei 4°C und 6800g zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in einem Volumen einer PBS/Ethanol-Mischung (1:2) aufgenommen. Die so fixierten Proben konnten entweder sofort hybridisiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Zum Nachweis von grampositiven Bakterien wurde eine Fixierung der Proben mit Ethanol durchgeführt. Das verflüssigte Sputum oder die Bakteriensuspension wurde hierzu mit einem Volumen eiskühlem Ethanol versetzt, mit der Pipette homogenisiert und entweder sofort hybridisiert oder bei -20°C gelagert. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Fixierungsschritten auf Eis gelagert.

2.2.1.2 Standard-FISH

Zur Standard-FISH wurde die Hybridisierung der Sputumproben zur anschließenden Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie auf teflonbeschichteten Objektträgern mit je sechs Aussparungen (Marienfeld, Bad Mergentheim, D) durchgeführt. Die Objektträger (OT) wurden vorher mit Haushaltsspülmittel entfettet, mit destilliertem

Wasser zweimal gewaschen, luftgetrocknet und anschließend mit Gelatine beschichtet, um die Probenhafung zu verbessern. Hierzu wurden die OT langsam in die noch warme Gelatinelösung eingetaucht und an einem staubfreien Ort bei Raumtemperatur getrocknet.

Die so vorbehandelten OT wurden pro ausgespartem Feld (OT-Feld) mit 10µl fixiertem Sputum oder Bakteriensuspension bestückt. Nach dem Trocknen der Präparate bei Raumtemperatur, wurden diese zur Dehydratation je 3min in 50%, 80% und 100% EtOH getaucht (aufsteigende Ethanolreihe) und luftgetrocknet. Vor der Hybridisierung grampositiver Bakterien (z.B. *S. pneumoniae*, *S. aureus*) musste eine enzymatische Permeabilisierung der grampositiven Zellwand durchgeführt werden. Das dazu verwendete Lysozym hydrolysiert die Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin und spaltet so Murein, das Polysaccharid der Zellwand (s.u.).

Zur Hybridisierung wurden pro OT-Feld 10µl der Hybridisierungslösung, bestehend aus einem Teil fluoreszenzmarkierter Sonde (50ng/ml) und 9 Teilen Hybridisierungspuffer, aufgetragen. In einer äquilibrierten feuchten Kammer wurden die Proben bei 46°C für 90min inkubiert (Hybridisierungsschritt). Anschließend wurden sie für 15min mit bei 48°C vorgewärmten Waschpuffer im Wasserbad gewaschen (Waschschritt). Zum Abschluss wurden die Objektträger mit PBS abgespült, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und entweder sofort ausgewertet oder zur weiteren Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

Zum enzymatischen Aufschluss der grampositiven Zellwand wurden vor der Hybridisierung im Anschluss an die aufsteigende Ethanolreihe und Lufttrocknung pro OT-Feld 10µl 10mM Tris aufgetragen und 5min bei 30°C äquilibriert. Anschliessend wurden 10µl Lysozym-Lösung (2mg/ml) zugegeben und 10min inkubiert. Zum FISH-Nachweis von Staphylokokken mit ihrer dreidimensional vernetzten Zellwand wurde zusätzlich ein Verdau mit Lysostaphin durchgeführt, das die Pentaglycin-Brücken der Oligopeptid-Seitenketten spaltet (Wu *et al.*, 2003). Dazu wurde jeweils 1µl Lysostaphin-Lösung (0,1mg/ml) pro OT-Feld aufgetragen und weitere 5min inkubiert. Alle Inkubationsschritte der Permeabilisierung wurden bei 30°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS abgespült und für 3min in 100% EtOH getaucht, um die Enzymreaktion abzustoppen. Nach der Lufttrocknung wurde die sondenhaltige Hybridisierungslösung aufgetragen und Hybridisierungs- und Waschschritt wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.1.3 Modifizierte FISH

Die ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz (HF), die sich bei der Auswertung der Sputumproben zeigte, lässt sich unterteilen in die Autofluoreszenz des Materials und Fluoreszenzsignale, die auf unspezifischen Bindungen der Sonden beruhen (s. Kapitel 3.2.1). Es wurden verschiedene Modifikationen an der Standard-FISH vorgenommen und hinsichtlich ihrer Effektivität, die HF zu minimieren, evaluiert. Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen sollten unspezifische Bindungen der Sondenmoleküle durch Absättigungsreagenzien blockiert werden. Zum anderen wurde versucht, die Autofluoreszenz zu unterdrücken und damit den Kontrast zwischen fluoreszenzmarkierten Strukturen und Hintergrund zu erhöhen (Fluoreszenzlöschung oder engl.: *Quenching*).

In der praktischen Durchführung wurden hierzu, soweit nicht anders beschrieben, dem Hybridisierungspuffer verschiedene Testsubstanzen (s. Tab. 2.4) unter Verringerung des Wasseranteils zugesetzt. Zeigte sich nach der Hybridisierung ein positiver Effekt, wurde versucht, diesen durch Vorinkubation der Probe mit der entsprechenden Substanz zu steigern.

2.2.1.3.1 Absättigung unspezifischer Bindungen der Oligonukleotidsonde

Zur Absättigung der unspezifischen Bindung des Oligonukleotidanteils der Sonde wurde der Hybridisierungslösung zum einen Thymus-DNA im Verhältnis 1:10 zugesetzt, zum anderen 1 µl der unmarkierten Sonde BET42a, welche die Beta-Gruppe der Proteobakterien erkennt.

Da neben dem Oligonukleotidanteil auch der Farbstoffanteil der Sonde unspezifisch an Probenbestandteile binden kann (s. Kapitel 3.2.2.2), wurde versucht, diese Bindungsstellen mit einem strukturell ähnlichen, jedoch außerhalb des relevanten Emissionsspektrums liegenden Farbstoff zu sättigen. Wegen seiner Ähnlichkeit zu dem hier verwendeten Farbstoff Cy3 wurde der Cyanofarbstoff Cy5 eingesetzt.

Bei einem angenommenen maximalen Markierungsverhältnis von Oligonukleotid zu Farbstoffmolekül von eins, entspricht die Farbstoffmenge einer Cy3-markierten Sonde 8 pmol pro µl Sondenlösung (Konzentration 50 ng/ml). Ausgehend von diesem Wert wurden zur Absättigung verschiedene höhere Konzentrationen an Cy5 eingesetzt. Eine Cy5-Lösung mit einer Farbstoffkonzentration von 16 pmol/µl wurde der Hybridisierungslösung entsprechend einer Sonde zugesetzt. Das entspricht einem Verhältnis von 2 Teilen Cy5 zu 1 Teil Cy3 in der Hybridisierungslösung.

Analog wurden Cy5-Lösungen mit folgenden Farbstoffkonzentrationen verwendet: 40pmol/µl (5:1), 80pmol/µl (10:1) und 299pmol/µl (40:1). Es wurde die Hybridisierung sowohl mit als auch ohne Vorinkubation (30min, 60min) mit den Cy5-Lösungen erprobt.

2.2.1.3.2 Fluoreszenzlöschung

Zur Fluoreszenzlöschung wurden verschiedene, in der Literatur als ‚*Quencher*‘ beschriebene (s. Kapitel 3.2.3) Substanzen erprobt. Die verwendeten Stoffe sowie ihre Konzentrationen sind Tabelle 2.4 zu entnehmen. Zeigte sich bei der mikroskopischen Auswertung ein positiver Effekt, so wurde durch eine Vorinkubation der Proben bei 46°C in der feuchten Kammer mit der entsprechenden Substanz versucht, den Effekt zu maximieren. Die verschiedenen getesteten Zeiten der Vorinkubation sind ebenfalls der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Substanz	Konzentration	Vorinkubation	Referenz
Dextransulfat	10%	nein	Matsuhisa <i>et al.</i> , 1994; Frischer <i>et al.</i> , 1996
Cystein C ₃ H-NO ₂ S	1,5mM; 7,5mM	30min, 60min	Fung <i>et al.</i> , 1998
Dextransulfat + Cystein	10% 1,5mM	nein	diese Arbeit
Denhardts Lösung	x1	nein	Matsuhisa <i>et al.</i> , 1994;
Dabsylchlorid	80µM; 800µM; 8mM	30min, 60min	Sato <i>et al.</i> , 1991
Biotin	80µM; 800µM; 8mM	30min, 60min	diese Arbeit

Tab. 2.4: Reagenzien zur Fluoreszenzlöschung der Hintergrundfluoreszenz, die eingesetzten Konzentrationen und Dauer der Vorinkubation.

Ebenfalls in der Literatur beschrieben ist der Einsatz von Essigsäure und Acet-Anhydrid-Lösung (Baskin *et al.*, 1995; Baskin *et al.*, 1999). Dazu wurden die probenbestückten Objektträger 30min in 95% EtOH bei Raumtemperatur vorbehandelt und anschließend 1-3h (s. Kap. 3.2.3) bei 65°C mit Denhardts Lösung vorinkubiert. Nach dem Waschen der Präparate mit destilliertem Wasser für 1min wurden diese mit der Ethanol-Essigsäure-Lösung für 20min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend luftgetrocknet. Nach 20min Inkubation mit der Acet-Anhydrid-Lösung, ebenfalls bei Raumtemperatur, wurden die Proben der aufsteigenden Ethanolreihe zugeführt. Anschließend wurde die Standard-FISH durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.1.2).

2.2.1.4 FISH in Suspension zur Auswertung mittels Durchflusszytometrie

Zur zytometrischen Messung der Proben musste das FISH-Standardprotokoll mit auf Objektträgern fixierten Proben (OT-FISH) so angepasst werden, dass die Probenhybridisierung im Flüssigmedium möglich wurde (Suspensions-FISH).

Die fixierte Probe (ein Volumen Sputum bzw. Bakteriensuspension) wurde 5min bei 6800g im Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Danach wurde ein Volumen EtOH zugegeben, das Gemisch mit der Pipette homogenisiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5min bei 6800g und Verwerfen des Überstandes, wurde ein Volumen Hybridisierungslösung (Verhältnis Sonde zu Hybridisierungspuffer entsprechend dem Standardprotokoll 1:10) zugegeben und mit der Pipette homogenisiert.

Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 90min bei 46°C im Heizblock und 300Upm inkubiert und anschließend für 5min bei 6800g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde 1ml auf 48°C vorgewärmter Waschpuffer zugegeben, das Gemisch homogenisiert und 15min bei 48°C im Heizblock und 300Upm inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut 5min bei 6800g zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die hybridisierten Bakterien wurden dann in ein Volumen PBS resuspendiert und sofort im Durchflusszytometer gemessen oder höchstens bis zu 24h bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.5 DNS-Färbung mit DAPI

Die 1:1000 mit PBS verdünnte DAPI-Stocklösung wurde bei 4°C gelagert. Die durch die aufsteigende Ethanolreihe fixierten Präparate wurden mit der DAPI-Arbeitslösung (1µg/ml) benetzt und für 10 – 20min bei 4°C in einer dunklen Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gespült und luftgetrocknet.

2.2.1.6 Indirekte Fluoreszenzmarkierung mit Biotin/Streptavidin

Die Präparate wurden nach den oben beschriebenen Protokollen entweder auf Objektträgern oder im Flüssigmedium mit biotinmarkierten Oligonukleotiden hybridisiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Probe mit 10µl der Streptavidin-PC5 Lösung für 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit PBS gewaschen, im Falle der OT-FISH

luftgetrocknet, und der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im Durchflusszytometer zugeführt.

2.2.2 Auswertung der hybridisierten Proben

2.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die hybridisierten Objektträger wurden zur Mikroskopie in Citifluor AF1 eingebettet, um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verlangsamen. Nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Proben mittels Fluoreszenz-Mikroskop (Leitz DM-RBE) mit einer Quecksilberlampe als Lichtquelle und mit Filtern verschiedener Anregungsbereiche (450 – 490nm für grüne Fluoreszenz; 515 – 560nm für rote Fluoreszenz und 340 – 360nm für den UV-Bereich zur DAPI-Auswertung) beurteilt.

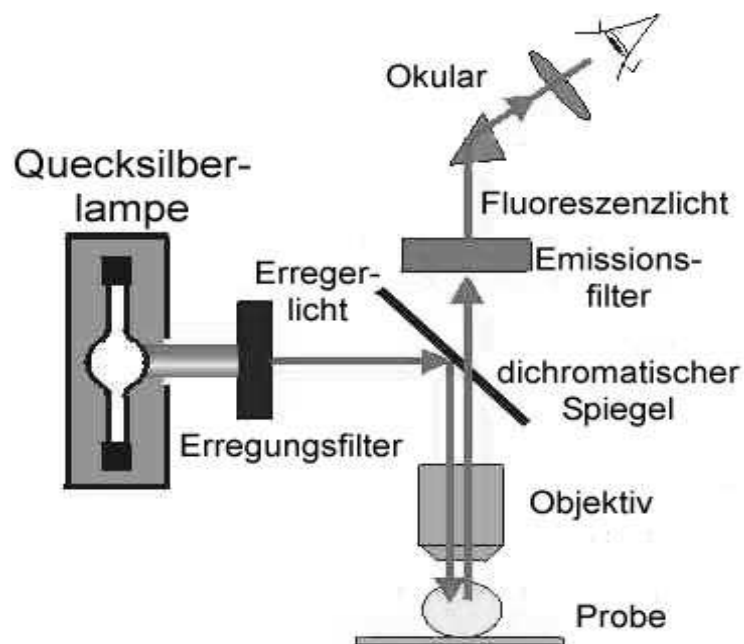


Abb 2.1.: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops (nach Wagner, 1995)

Die Bilder wurden mittels konfokalem Lasermikroskop (Leica TCS TN) ausgestattet mit einem Argonlaser (458, 476, 488 und 514nm) erstellt. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der dem Gerät mitgelieferten Software (Leica TCS TN 1.6.582). Die konfokale Laserscanningmikroskopie ermöglicht eine dreidimensionale Auflösung

und scharfe Trennung einzelner Ebenen des mikroskopischen Präparates, wodurch die Bildqualität gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie enorm verbessert wird. Dieses gelingt durch eine besonders kleine Detektorlochblende, die bewirkt, dass Licht nur in einem engen Fokusbereich detektiert wird. Objektteile außerhalb dieser Brennebene werden ausgeblendet und es wird nur wenig Fluoreszenzstreulicht aus anderen Objektbereichen detektiert, was die Bildschärfe maximiert. Um eine bildliche Darstellung des Präparates zu erzielen, wird die Probe rasterförmig vom Laser abgetastet (engl.: *scanning*), und die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird für jeden abgetasteten Bildpunkt durch Photodioden gemessen. Um ein dreidimensionales Bild zu erzeugen, muss das Präparat in allen drei Raumrichtungen abgetastet werden. Viele Bilder unterschiedlicher Brennebenen können dann mit Hilfe der Bildverarbeitung zu einem neuen Bild mit sehr guter Tiefenschärfe rekonstruiert werden (Wagner, 1995).

2.2.2.2 Durchflussszytometrie

Zur Quantifizierung der Bakterien in den Proben (Sputum, Bakteriensuspension) wurde die Durchflussszytometrie eingesetzt. Das Prinzip dieser Technik besteht darin, die zu messenden Zellen einzeln durch einen Laserstrahl zu führen und die dabei entstehenden Lichtstreuungen sowie die vorhandene Fluoreszenz zu messen. Die Vereinzelung der Zellen erfolgt, indem die Probenflüssigkeit in das Zentrum einer stetig fließenden Hüllflüssigkeit (engl.: *sheath fluid*) eingeführt wird. Durch den Druck des umgebenden Mediums bleibt die Probenflüssigkeit während des Durchflusses durch die Messzelle zentriert und die darin vorhandenen Zellen ordnen sich hintereinander an.

Tritt eine Zelle in den Lichtstrahl des Lasers ein, so streut sie dieses Licht. Ein Teil wird in kleinen Winkeln zum eigentlichen Laserstrahl gestreut, der sog. ‚*forward scatter*‘. Dieser ist abhängig von der Größe der Zelle. Die Menge an Licht, die im rechten Winkel zum Laserstrahl gestreut wird, bezeichnet man als ‚*sideward scatter*‘. Sie ist proportional zur Menge der Granula in der Zelle.

Zusätzlich können die zu messenden Zellen fluoreszenzmarkiert werden, sei es mit Antikörpern oder – wie im Fall der vorliegenden Arbeit – mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden. Der Laser emittiert Licht der Wellenlänge 488nm. Die Farbstoffe absorbieren das Licht und strahlen es mit einer größeren Wellenlänge wieder ab.

Vier Filter separieren das abgestrahlte Licht nach verschiedenen Wellenlängen, so dass bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig gemessen werden können.

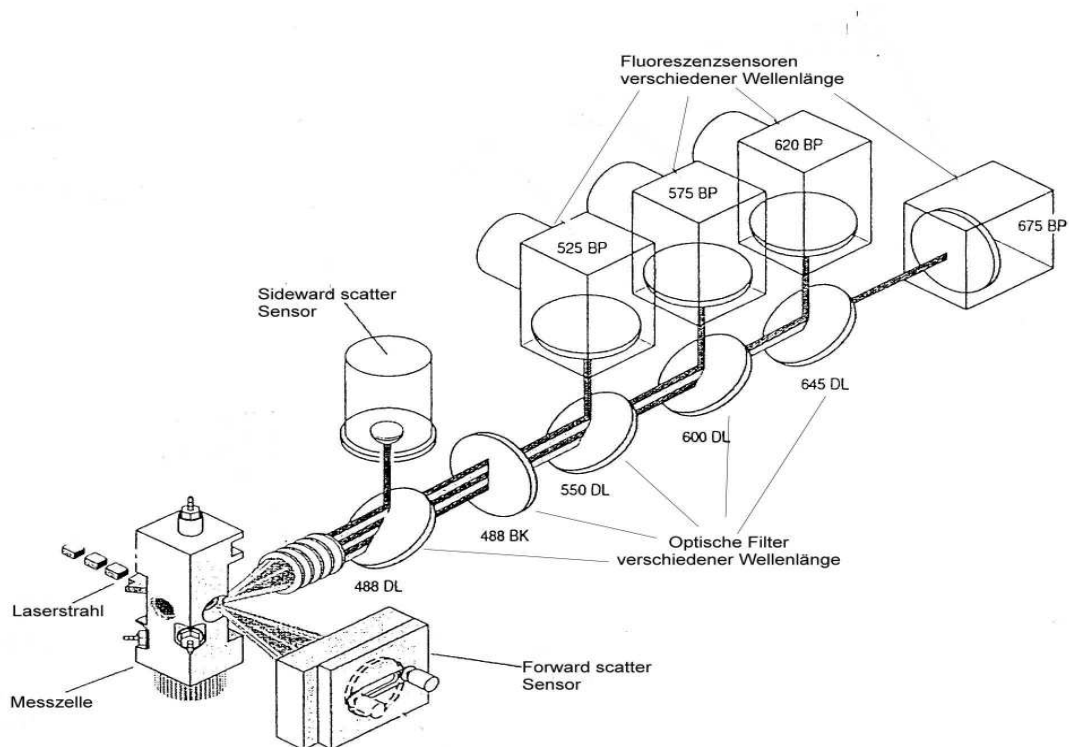


Abb 2.2: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers mit vier Filtern (nach Coulter® 1998)

Die Lichtsignale, sowohl gestreutes Licht als auch Fluoreszenz, werden von Sensoren aufgefangen und in elektrische Signale umgewandelt. Dabei bestimmt die Licht- oder Fluoreszenzintensität die Höhe des Impulses, während die Verteilung der Fluoreszenz über die Zelle dessen Breite bestimmt.

Nach elektronischer Weiterverarbeitung können die Signale in Histogrammen dargestellt werden, in denen sie in Beziehung zur Anzahl der gemessenen Ereignisse oder in Beziehung zueinander gesetzt werden (s. Abb 3.14 – 3.18).

So kann man die Verteilung bestimmter Merkmale in der gemessenen Population beurteilen.

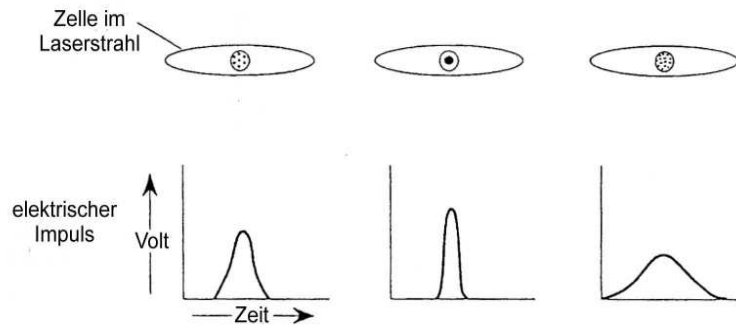


Abb 2.3: Drei Zellen mit derselben Menge an Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität bestimmt die Höhe des elektrischen Pulssignals, während die Verteilung der Fluoreszenz in der Zelle dessen Breite bestimmt. (nach Coulter® 1998)

2.2.2.3 Fluoreszenzmessung im Spektrometer (Fluorometer)

Hier folgt die Fluoreszenzmessung dem photometrischen Messprinzip, bei dem Erregerlicht der Wellenlänge λ die Probe durchstrahlt. Die dort befindliche fluoreszierende Substanz (P, im Fall der vorliegenden Arbeit die an die rRNA der Bakterien gebundenen fluoreszenzmarkierten Sondenmoleküle) absorbiert die Lichtenergie und gibt einen Teil davon als Fluoreszenzlicht der größeren Wellenlänge λ_1 wieder ab. Das so erzeugte Licht strahlt in alle Richtungen und kann mit einem Detektor, z.B. senkrecht zur Achse des einfallenden Lichtes, gemessen werden. Die Strahlungsleistung des Fluoreszenzlichtes ist im Bereich kleiner Mengen proportional zur Konzentration der fluoreszierenden Substanz. Messfehler durch Streuung des Erregerlichtes werden durch einen optischen Filter vor der Messzelle, der das kurzwellige Licht λ nicht passieren lässt, ausgeschaltet.

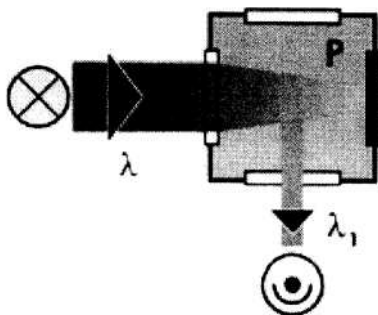


Abb 2.4:
Schematische
Darstellung der
Funktionsweise
eines Fluorometers

2.2.3 Einfluss von Lagerungsbedingungen und Antibiotikabehandlung auf FISH

Eine Kultur von *P. aeruginosa* wurde über Nacht in LB-Medium bei 37°C im Schüttler inkubiert. Frisches LB-Medium wurde mit dieser Ü/N-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Diese Suspension wurde im Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war, die Bakterien sich also in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Bakteriensuspension wurde nun geteilt: zwei Proben wurden bei Raumtemperatur, zwei weitere bei 4°C gelagert. Über 7h, also etwa solange sich die Zellen in der Phase des exponentiellen Wachstums befanden, wurde stündlich ein 1ml Aliquot entnommen, später dann 24stündlich bis 120h. Zu jedem Zeitpunkt wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Ein Teil (500µl) jeder Probe wurde PFA-fixiert und der FISH zugeführt. Von einem weiteren Teil (500 µl) wurde durch serielle Verdünnung in PBS mit 1% Tergitol die Zahl kultivierbarer Bakterien (koloniebildende Einheiten, KBE pro ml) bestimmt. Die Verdünnungen 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ wurden im Doppelansatz auf TSA-Medium ausplattiert, 24h bei 32°C inkubiert und anschließend die Keimzahl bestimmt. Der ermittelte Wert wurde als Referenzwert für die Zählung der fluoreszenzhybridisierten Keime im Durchflusszytometer verwendet. Durch Einsatz der Flow-CountTM Fluorospheres (BeckmanCoulter) konnte dabei die absoluten Anzahl von Bakterien in der Probe bestimmt werden.

In einem weiteren Ansatz wurde ein Teil der Ü/N-Kultur mit Ciprofloxacin versetzt, so dass die Endkonzentration 2µg/ml betrug. Diese liegt damit 2 Titerstufen über der MHK von 0,5µg/ml, die vorher für den verwendeten Stamm von *P. aeruginosa* (ATCC 25853) bestimmt worden war. Von dieser Suspension sowie einer Kontrolle ohne Antibiotikazusatz, beide bei Raumtemperatur gelagert, wurden für die ersten sieben Stunden stündliche Proben entnommen, dann nach 10, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Ein Teil der Proben wurde wiederum PFA-fixiert und der FISH sowie der DAPI-Färbung und der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop zugeführt. Der andere Teil wurde wie oben beschrieben verdünnt, ausplattiert und die Zahl der KBE nach 24 Stunden Inkubation bestimmt.

3 Ergebnisse

Beim Krankheitsbild der CF steht die chronisch verlaufende Pneumonie im Vordergrund, welche mit einem begrenzten und CF-typischen Erregerspektrum assoziiert ist (v.a. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, BCC, *S. maltophilia*). Mit zunehmendem Alter der Patienten dominiert *P. aeruginosa*, der hauptverantwortlich für die hohe Mortalität der CF-Patienten ist. Die spezifische und frühe mikrobiologische Diagnose der CF-Erreger ist bedeutsam für den Beginn einer antibiotischen Therapie und der Durchführung hygienischer Maßnahmen, z.B. der Trennung von besiedelten und nicht-besiedelten Patienten, mit dem Ziel, eine Übertragung der Erreger zu vermeiden.

Die regelmäßig durchgeführte mikrobiologische Diagnostik von Sputumproben der CF-Patienten wird in Deutschland zumeist in spezialisierten Zentren durchgeführt. Die Transportwege für klinische Untersuchungsmaterialien sind dabei häufig von variabler Länge und mit unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der Proben verbunden.

In den letzten Jahren haben sich in der mikrobiologischen Diagnostik zunehmend molekulare Methoden, insbesondere nukleinsäureamplifizierende Verfahren zum raschen und spezifischen Erregernachweis etabliert. Ebenso hat sich der Einsatz der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur mikrobiologischen Diagnostik bewährt. Wegen der hohen Spezifität und Sensitivität sowie des schnellen Erregernachweises ist der Einsatz der FISH-Technik in der CF-Diagnostik wünschenswert. Die Qualität der Ergebnisse ist jedoch von der rechtzeitigen Fixierung der Proben abhängig, um eine ausreichende Anzahl an bakteriellen Ribosomen zu erhalten. Daher stellt sich die Frage, ob und inwieweit bei der Durchführung einer FISH als Routinemethode die Ergebnisse durch die Lagerung des Materials beeinflusst werden. Des weiteren ist zu bedenken, ob sich die FISH auch auf Proben von bereits mit Antibiotika anbehandelten Patienten anwenden lässt und wie sich die Ergebnisse im Vergleich zur konventionellen Kultur verhalten.

Ein besonderes Problem bei der Durchführung der FISH-Diagnostik an respiratorischen Untersuchungsmaterialien (z.B. Sputum, Trachealsekret u.a.) stellte bisher die ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz (HF) dar. Die HF lässt sich unterteilen in die Autofluoreszenz des Materials und die unspezifische Fluoreszenz nach Hybridisierung, die vermutlich durch die unspezifische Bindung der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Oligonukleotide (FISH-Sonden) hervorgerufen

wird (s. Kap. 3.2.1). Eine starke HF kann selbst bei erfahrenem Untersucher und insbesondere bei geringer Erregerzahl die mikroskopische Auswertung enorm erschweren und die Ergebnisse u.U. verfälschen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Frage nach der Durchführbarkeit der FISH als Routinemethode in der mikrobiologischen CF-Diagnostik zu klären und weiterhin, durch die systematische Modifikation des FISH-Standardprotokolls die HF zu minimieren. Des Weiteren sollte die Möglichkeit eines schnellen Nachweises der häufigsten bakteriellen Erreger bei CF einschliesslich der Quantifizierung der Erregermengen mittels einer Kombination von FISH und Durchflusszytometrie evaluiert werden.

3.1 Validität der Analysedaten der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

3.1.1 Reproduzierbarkeit der Erregermengen bei verlängerter Lagerung von Sputum

In der mikrobiologischen Routinediagnostik wird gewonnenes Untersuchungsmaterial häufig nicht sofort nach der Entnahme weiter verarbeitet, sondern muss i.d.R. zunächst transportiert und u.U. auch zwischengelagert werden (sog. Präanalytik). Abhängig von Transportzeiten (z.B. ‚in house‘-Versand, Postversand) und Lagerungsbedingungen können die Ergebnisse (Sensitivität des Erregernachweises, relative Erregermengen) in der späteren Auswertung je nach nachgeschaltetem Untersuchungsverfahren unterschiedlich beeinflusst bzw. sogar verfälscht werden. Die FISH-Diagnostik ist an das Vorhandensein der bakteriellen Ribosomen gebunden und damit insbesondere von einer zeitnahen Probenfixierung abhängig, um einen sensitiven Erregernachweis zu gewährleisten. Ribosomen und rRNA gehören zu den ersten bakteriellen Makromolekülen, die bei Verlangsamung des Stoffwechsels, z.B. durch Nährstoffmangel oder Kühlung, abgebaut werden. Schon nach 24h unter Nährstoffdeprivation reduziert sich der Anteil von intakter 16S und 23S rRNA auf bis zu 10% des Wertes in der exponentiellen Wachstumsphase (Davis *et al.*, 1986; Kalpaxis *et al.*, 1998). Eine rasche Weiterverarbeitung der Proben vor einer FISH bedingt somit eine höhere Sensitivität der Diagnostik, was gerade bei niedrigen Erregermengen in der Probe von Bedeutung sein kann.

Bei Quantifizierung der Erregermengen in der Kultur hingegen ist es wichtig, ein Überwuchern von nur in geringer Keimzahl vorhandenen oder aber nur langsam

wachsenden Bakterien durch andere Erreger zu verhindern. Daher werden die meisten mikrobiologischen Probenmaterialien bis zur Weiterverarbeitung typischerweise bei 4°C gelagert.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu verifizieren, inwieweit die Zeit des Probentransportes, der üblicherweise bei Raumtemperatur stattfindet, bzw. eine Zwischenlagerung der Probe bis zur Fixierung bei 4°C die Analyseergebnisse von Kultur und FISH beeinflussen.

P. aeruginosa wurde hierfür als bedeutendster CF-Erreger für den *in vitro* Versuch ausgewählt. Dabei wurde die Keimzahl in der Probe über einen Zeitraum von 120h bei Raumtemperatur und bei 4°C beobachtet. Bei jeder Probenentnahme wurde die Erregermenge in der Probe mittels Messung der optischen Dichte (OD_{600}), über die Analyse im Durchflussszytometer nach Suspensions-FISH mit Fluoreszein-markierten Sonden *PsaerA* und *PsaerB* (s. Kap. 3.3) und kulturell durch die Zählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE/ml) nach Ausplattierung einer seriellen Verdünnungsreihe auf TSA-Medium ermittelt.

3.1.1.1 Lagerung bei Raumtemperatur

Betrachtet man die bei Raumtemperatur (RT) erhobenen Daten (s. Abb. 3.1), so findet sich hinsichtlich der Erregermenge sowohl nach Auszählung der KBE als auch bei der Messung der Optischen Dichte ein langsamer, aber stetiger Anstieg innerhalb der ersten sieben Stunden. Die Kurve der zytometrisch erfassten Werte steigt sehr viel steiler an, wobei zu beachten ist, dass sie für die ersten fünf Stunden um eine Zehnerpotenz unter den KBE/ml liegt. In der Folge wurden die Werte in 24stündigen Abständen erfasst, daher sind Anstieg und Gefälle der Kurven erwartungsgemäß steiler. In allen drei Erfassungsmethoden wird der Maximalwert der Erregermenge bei 48h erreicht, wobei sich hier KBE und zytometrischer Wert entsprechen. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin fallen die Kurven wieder ab, die deutlichste Veränderung zeigt sich wiederum bei den zytometrisch erfassten Werten, die um fast zwei Zehnerpotenzen fallen.

Zu beachten ist bei der zytometrischen Auswertung der weiter unten (Kap. 3.3.1.1) beschriebene Verlust von Probenmaterial durch die erforderlichen Verarbeitungsschritte, der etwa 60% beträgt. Die in Abb. 3.1c gezeigten Werte sind bereits auf 100% hochgerechnet. Dieses bedeutet, dass Messfehler, insbesondere

bei geringen Werten, stark ins Gewicht fallen. Eine fehlende Vereinzelung der Bakterien ist ein weiterer Faktor, der zu geringen Meßwerten führt.

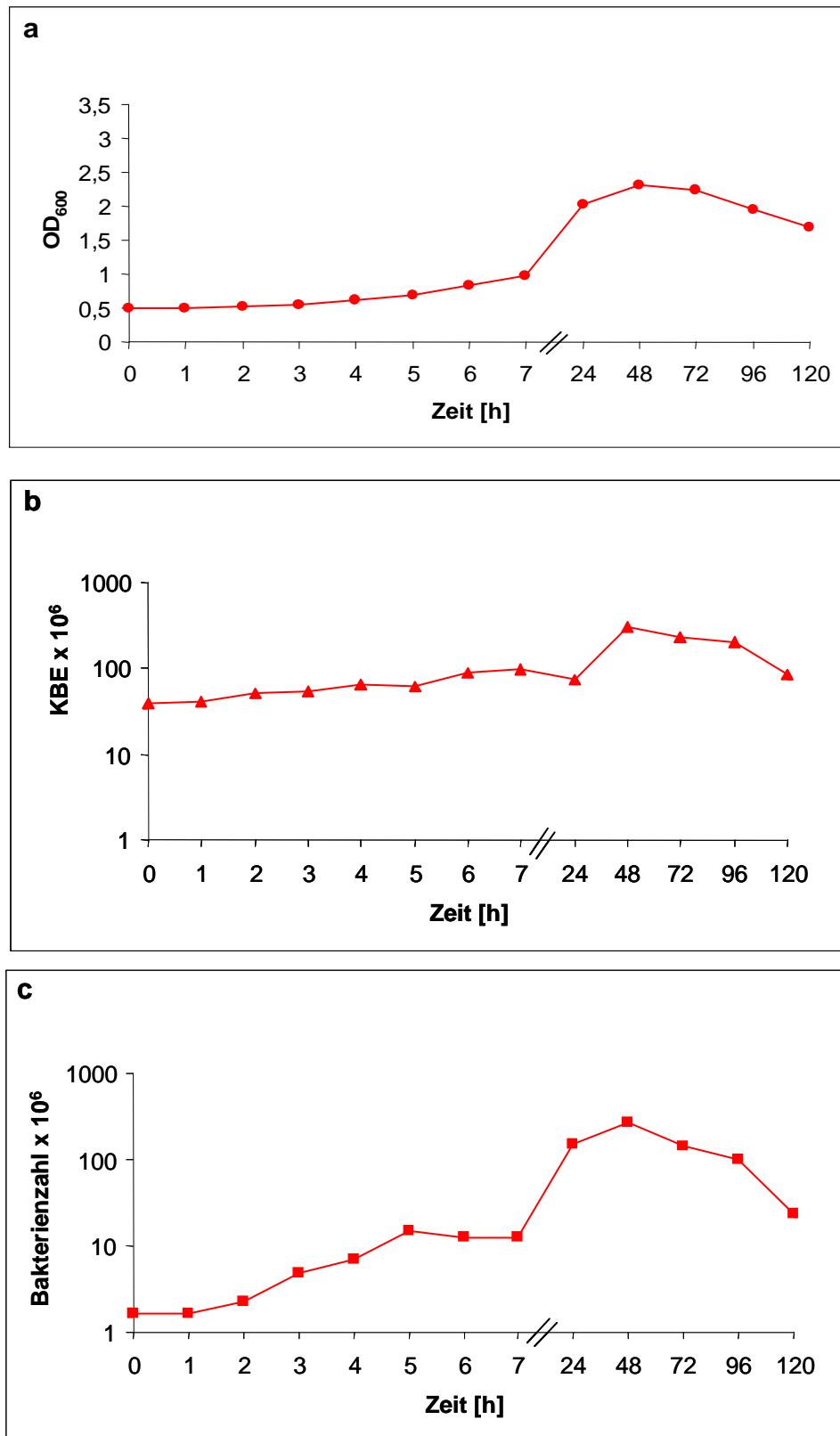


Abb. 3.1a-c: Wachstumskurven von *P.aeruginosa* bei Lagerung bei Raumtemperatur. Für die ersten sieben Stunden wurden stündlich Proben genommen, dann alle 24h. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Optische Dichte (OD₆₀₀) (a), sowie die Keimzahlen als KBE in der Kultur (b) und im Durchflusszytometer nach FISH (c) bestimmt.

Im Hinblick auf die Ausgangsfrage lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass sich unter den Versuchsbedingungen bei ausreichender Nährstoffversorgung und in Abwesenheit hemmender Substanzen wie Antibiotika bereits nach 7h Lagerung der Proben bei Raumtemperatur die Erregermengen deutlich über den beim Zeitpunkt 0 erhobenen liegen. Nach 24 h und mehr – der realistischen Dauer eines Transportes per Post bzw. der Lagerung von Proben, die nicht am selben Tag weiterverarbeitet werden – können die Keimzahlen von *P. aeruginosa* ein Vielfaches des Ausgangswerts betragen. Diese könnten damit die quantitative und durch Überwucherung anderer Bakterien auch die qualitative Analyse verfälschen. Der Nachweis durch FISH ist bis mindestens 120h möglich, wobei die Auswertung im Durchflusszytometer zwar qualitative Ergebnisse, jedoch keine verlässlichen quantitativen Werte liefert.

3.1.1.2 Lagerung bei 4°C

Im Vergleich dazu sind die Werte der bei 4°C gelagerten Proben über den gesamten Erhebungszeitraum relativ konstant. Die niedrigere Temperatur verhindert eine ausgeprägte Vermehrung der Erreger und stellt somit die optimale Lagerungsbedingung für die quantitative Kultur dar. Auch der Nachweis von *P. aeruginosa* mittels FISH ist noch nach 120stündiger kühler Lagerung möglich. Dieses lässt sich auf die Fähigkeit dieses Bakteriums, seinen Stoffwechsel auch in kühler Umgebung aufrechtzuerhalten, zurückzuführen. Wie zuvor jedoch liegen die zytometrisch erhobenen Werte um etwa eine Zehnerpotenz unter den KBE. Dafür sind zwei Erklärungen denkbar. Zum einen könnte doch eine Verlangsamung des bakteriellen Stoffwechsels vorliegen, so dass weniger rRNS nachgewiesen und damit weniger fluoreszierende Ereignisse im Durchflusszytometer gezählt werden. Oder aber es liegt wie bereits in Kapitel 3.1.1.1 diskutiert ein Messfehler aufgrund der geringen Keimzahl zugrunde.

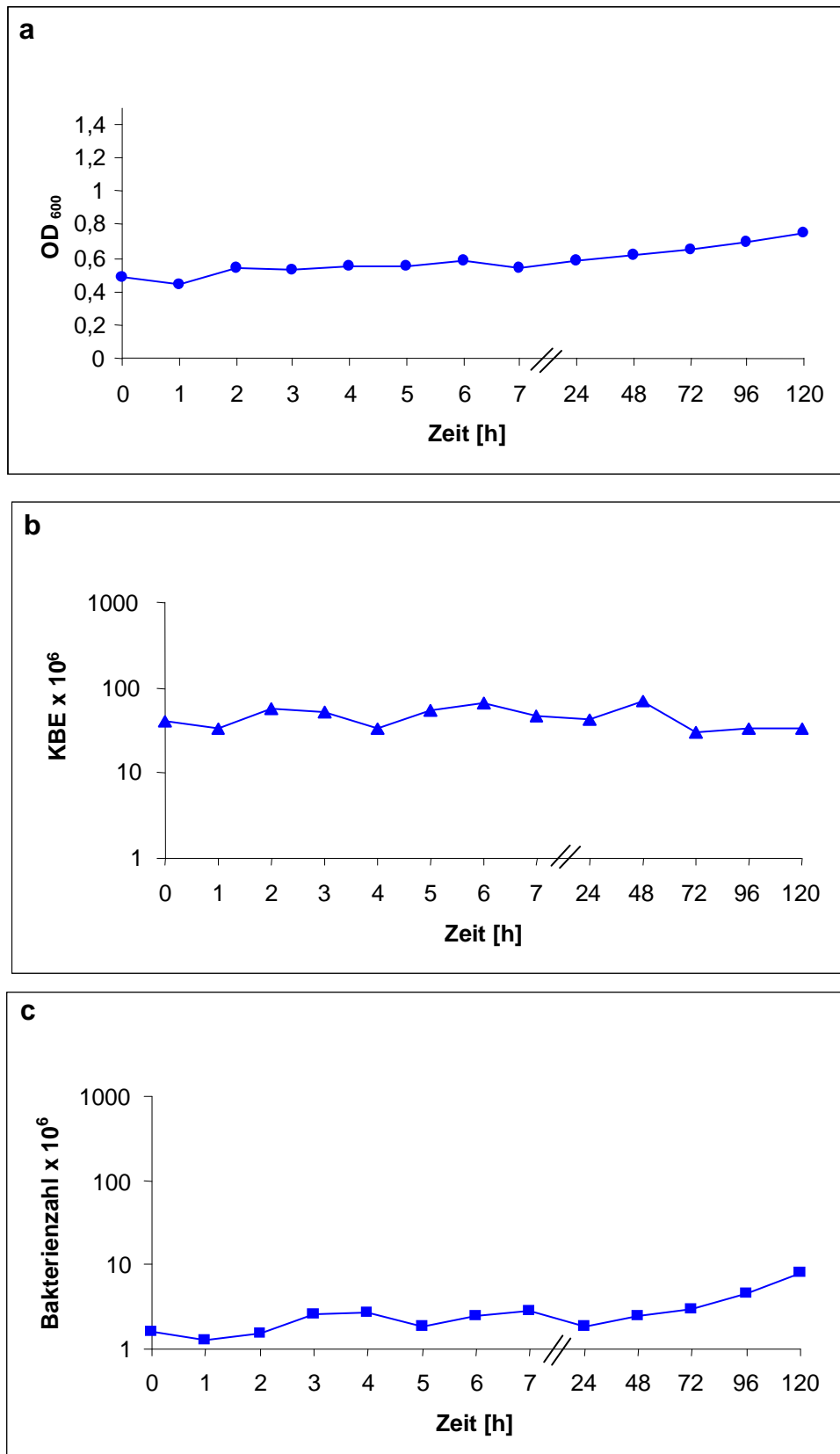


Abb. 3.2a-c: Wachstumskurven von *P. aeruginosa* bei Lagerung bei 4°C. Wie zuvor wurden zu jedem Messzeitpunkt die OD₆₀₀ (a), KBE/ml (b) und die Zellzahl im Durchflusszytometer nach FISH (c) bestimmt.

3.1.2 FISH nach Vorbehandlung mit Ciprofloxacin

Gerade bei CF-Patienten sind häufige Antibiotikatherapien notwendig. Wird z.B. im Falle einer geplanten Früheradikation von *P. aeruginosa* oder auch bei einer Exazerbation mit einem empirischen Antibiotikum ohne Vortestung anbehandelt, so ist es hilfreich, Verlaufskontrollen vorzunehmen, um den Erfolg der Behandlung nachzuvollziehen. Dabei kann bei empfindlichem Erreger die Erregermenge zunächst abnehmen und unterhalb die Nachweisgrenze der Kultur fallen oder aber die kulturelle Anzucht kann durch hemmende Substanzen in der Probe u.U. falsch negativ ausfallen. Es stellt sich die Frage, ob mit Hilfe der FISH der Erregernachweis grundsätzlich auch unter Antibiotikatherapie geführt werden kann, ob und wie lange also ausreichend ribosomale RNS in den Zellen vorhanden ist. Darüber hinaus ist interessant, wie der FISH-Nachweis sich im Vergleich zur kulturellen Anzucht verhält. Um dieses zu untersuchen, wurde eine Reinkultur von *P. aeruginosa* in einem Medium inkubiert, das das bakterizide Antibiotikum Ciprofloxacin in einer Konzentration von 2µg/ml enthielt und damit deutlich über der MHK des Bakterienstammes von <0.5µg/ml lag. In einem Zeitraum bis zu 96h wurden Proben genommen, von denen die Keimzahl sowohl in der Kultur, als auch mikroskopisch nach FISH und DAPI-Färbung bestimmt wurden. Dieselben Analysen wurden mit Kontrollproben ohne Antibiotikazusatz durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Die Keimzahlen der Kontrollprobe steigen wie zu erwarten exponentiell an, bis sie nach etwa 6h ein Plateau erreichen und dann nach 48h wieder leicht abfallen. Die Ergebnisse aller drei Messmethoden entsprechen sich dabei. In der Probe mit Antibiotikazusatz fällt die in der Kultur bestimmte Zellzahl dagegen bereits nach einer Stunde rapide ab, die Organismen sind nicht mehr nachweisbar. Die klassische Biologie würde sie als nicht mehr lebend definieren (Postgate, 1976). Sowohl der Nachweis von DNS (durch DAPI-Färbung) als auch von rRNS in der FISH, zeigt dagegen eine stabile Zellzahl an, die erst nach 24 Stunden abfällt, wobei die Werte der FISH in geringem Maße unter denen der DNS-Färbung liegen. DNS bleibt demnach länger stabil und nachweisbar als die rRNS. Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ist jedoch nach diesen Ergebnissen durchaus zum Erregernachweis auch nach Anbehandlung mit Antibiotika geeignet und in dieser Hinsicht der Kultur überlegen.

Interessant ist weiterhin, dass sich die Werte von mikroskopischer Auszählung der Erregerzahl und KBE in der Kontrollprobe weitgehend entsprechen. Dieses steht im Gegensatz zu den zytometrisch erhobenen Werten des vorangegangenen Experimentes und unterstützt die Vermutung, dass ein Messfehler aufgrund des großen Probenverlustes vorliegt.

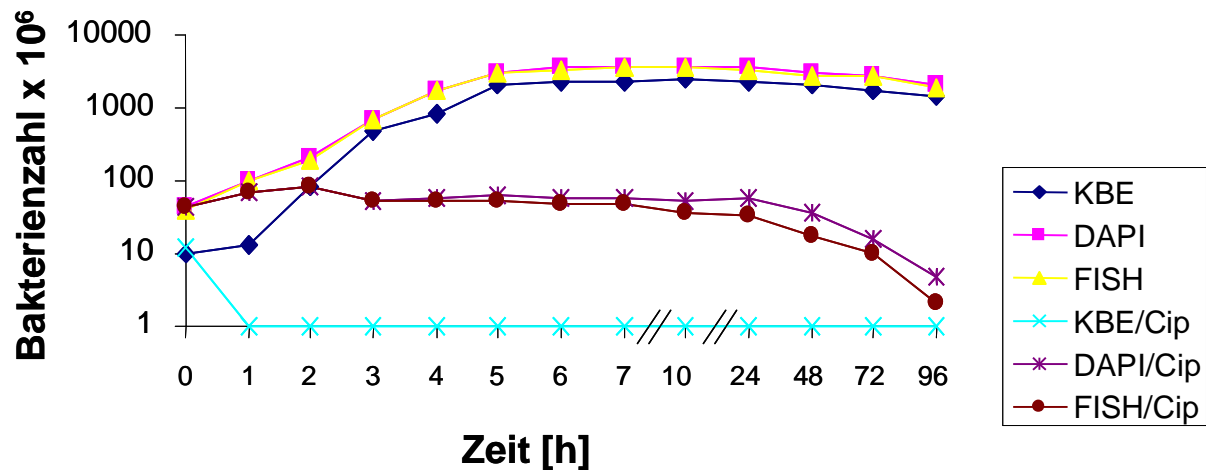


Abb. 3.3: Wachstumsreihe von *P. aeruginosa* mit und ohne Antibiotikazusatz (Ciprofloxacin, 2µg/ml) zum Nährmedium, Zellzahlen erhoben als KBE in Kultur, mikroskopisch nach FISH (mit Fluoreszeinmarkierten Sonden PsaerA und PsaerB) und nach DAPI-Färbung. Auffällig ist der steile Abfall der KBE bei Zusatz von Ciprofloxacin, während die Keimzahlen nach FISH und DNS-Färbung noch bis zu 24 stabil sind.

3.2 Reduktion der Hintergrundfluoreszenz bei der Fluoreszenz **in situ Hybridisierung (FISH) von CF-Sputum**

3.2.1 Ursachen der Hintergrundfluoreszenz

Das Tracheobronchialsekret besteht in erster Linie aus Wasser sowie aus geringen Mengen von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Stickstoff und Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus untergegangenen Epithelzellen (Houtmeyers *et al.*, 1999; Medici *et al.*, 2001). Im Vergleich zu anderen Patientenkollektiven ist bei CF-Patienten der Wassergehalt des Tracheobronchialsekrets infolge des Defekts des CFTR-abhängigen Ionentransports signifikant verringert. Zudem beinhaltet CF-Sputum massenhaft neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie Zelldetritus und damit erhöhte Mengen an freier DNS, welche durch den permanenten Untergang von Abwehrzellen entstehen. Diese steigert als extrem hochmolekulares Polyanion die Zähigkeit des Sekrets zusätzlich (Shak *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 2003; Sriramulu *et al.*, 2005).

Betrachtet man natives CF-Sputum unter dem Fluoreszenzmikroskop, so zeigt sich unter allen Emissionsfiltern eine unterschiedlich stark ausgeprägte Autofluoreszenz, die sowohl innerhalb einer Probe als auch zwischen verschiedenen Proben variabel ist (Abb. 3.6, S. 54).

Hybridisiert man Sputum mit FISH-Sonden, so fallen neben den spezifisch markierten Bakterien und der bereits in unhybridisiertem Zustand bestehenden Autofluoreszenz weitere fluoreszierende Strukturen auf (unspezifische Fluoreszenz, s. Abb. 3.7). Zum einen zeigen diese eine lokale granuläre Anordnung, was morphologisch einem Zellkern oder zytoplasmatischen Granula gleicht. Zum anderen erscheinen sie als stark fluoreszierende, heterogen verteilt liegende, einzelne Partikel von sehr unterschiedlicher Morphologie, die aber u.U. mit markierten Bakterien verwechselt werden können.

Zur genaueren Lokalisation der erstgenannten Strukturen wurde ein Präparat gleichzeitig mit der Sonde EUB338 (mit Fluoreszein markiert) zum Nachweis von *Bacteriae* insgesamt und der Sonde *PsaerA* (mit Cy3 markiert) zum spezifischen Nachweis von *P. aeruginosa* hybridisiert und anschließend mit dem DNS-Farbstoff DAPI angefärbt (Abb. 3.9). Unter dem Mikroskop stellt sich die mit DAPI angefärbte DNA der Bakterien und der eukaryoten Zellkerne blau dar. Im Phasenkontrast und eindeutiger im Vergleich von rotem und grünem Filter wird deutlich, dass die zuvor

gesehenen Granula nicht mit den Zellkernen überlagern, sondern diese umgeben, also im Zytoplasma der Zellen liegen.

Die Form der Zellen legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um im Sputum vorhandene Entzündungszellen handelt. Mögliche Bindungsstellen für die FISH-Sonden sind dabei Makromoleküle in den Granula der neutrophilen Granulozyten oder aber die Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Die bei allen Lebewesen in Ribosomen vorkommenden rRNS-Moleküle besitzen eine funktionelle Konstanz und somit stark konservierte Bereiche in Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur (s. Abb. 3.4). Diese Parallelen könnten die Ursache für eine unspezifische Bindung der gegen die bakteriellen rRNS Moleküle gerichteten Oligonukleotide an strukturell ähnliche Bereiche der leichter zugänglichen humanen rRNS sein (Woese, 1987, Zaman *et al.*, 2003, Kaul *et al.*, 2005).

Als Ursache der fluoreszierenden Partikel kommen unspezifische Bindungen an freie DNS, Proteine oder die Oligomerisierung mehrerer Sondenmoleküle in Frage.

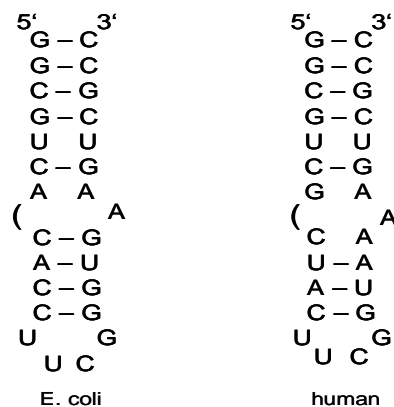


Abb. 3.4: Strukturelle Ähnlichkeit der Sekundärstruktur der A-Stelle (*attachment site*) der 16S rRNA von *E. coli* und der humanen 18S rRNA (nach Kaul *et al.*, 2005)

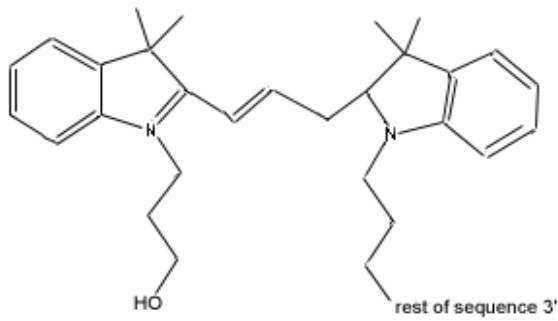
3.2.2 Absättigung der unspezifischen Fluoreszenz

3.2.2.1 Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Oligonukleotide

Geht man davon aus, dass die FISH-Sonden auch an humane rRNS, freie Nukleinsäuren oder Makromoleküle binden, so gibt es dafür zwei mögliche Komponenten, den Oligonukleotid- und den Farbstoffanteil der Sonde. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Oligonukleotide wurde der Zusatz von unmarkierten Nukleinsäuren (Oligonukleotide bzw. Polynukleotide) zur Hybridisierungslösung erprobt. Es wurden hochmolekulare Thymus-DNS und die nichtmarkierte Oligonukleotidsonde BET42a zur verwendet. In beiden Fällen ließ sich jedoch nur eine minimale Reduktion der HF nachweisen, so dass man davon ausgehen kann, dass die unspezifische Nukleotidbindung nur einen geringen Anteil an der unspezifischen Fluoreszenz hat (s. Tab. 3.1).

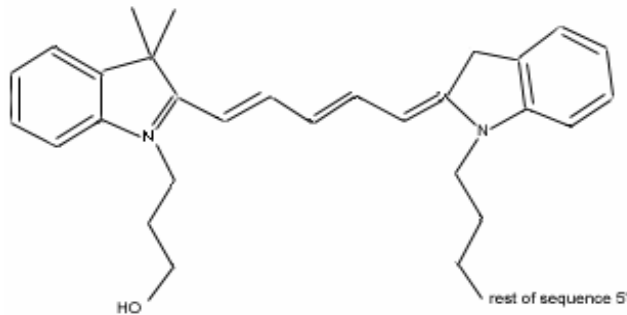
3.2.2.2 Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Farbstoffmoleküle

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Farbstoffe als weiterer Bestandteil der FISH-Sonden unspezifische Bindungen eingehen, wurden Präparate lediglich mit freiem Fluoreszein und Cy3 inkubiert. Unter dem Mikroskop zeigte sich das gleiche Ausmaß an zuvor beschriebener unspezifischer Fluoreszenz wie bei der Hybridisierung mit den markierten Sonden, sowohl die granulaähnlichen Strukturen als auch heterogen verteilte fluoreszierenden Partikel sind zu sehen (Abb. 3.8). Daraus folgend scheinen also v.a. die Farbstoffmoleküle der Sonden für die unspezifische Fluoreszenz verantwortlich zu sein. Deren Bindungsstellen sollten sich wiederum durch Zugabe einer strukturell ähnlichen Substanz absättigen lassen. Um diese Frage experimentell zu überprüfen, wurde der Cyanofarbstoff Cy5 ausgewählt, der strukturell dem verwendeten Cy3 ähnelt, dessen Emissionslicht mit einem Maximum bei 596nm jedoch außerhalb des Filterspektrums des verwendeten Fluoreszenzmikroskops liegt.



	Absorption Max. (nm)	Emission Max. (nm)
Cy3	550	570
Cy5	649	670

a



b

Abb 3.5: Strukturformeln der Cyanofarbstoffe Cy3 (a) und Cy5 (b) sowie ihre Absorptions- und Emissionsmaxima

Damit der freie Farbstoff Cy5 vollständig an die unspezifischen Bindungsstellen binden konnte, wurde Cy5 in höheren Konzentrationen als der Sondenfarbstoff Cy3 eingesetzt. Dazu wurde zunächst die Cy3-Menge (8pmol) in einem µl fertiger Sondenlösung (50ng/ml) bestimmt und daraus die Konzentration des zusätzlichen Farbstoffes berechnet. Zur HF-Reduktion wurde die doppelte, fünffache, zehnfache und vierzigfache Menge von Cy5 eingesetzt. Zudem wurde ein Teil der Präparate vor der Hybridisierung mit den Farbstofflösungen der oben genannten Konzentrationen inkubiert.

Nach der Vorinkubation wirkten sowohl die Autofluoreszenz als auch die unspezifische Fluoreszenz im Vergleich zu den nach Standardprotokoll hybridisierten Proben deutlich abgeschwächt. Jedoch erscheint das gesamte Präparat im Rot-Filter des Mikroskops mit einem Rotschleier, dem vermutlich die Überlappung der Emissionsspektren der beiden Farbstoffe zu Grunde liegt. Es wird dadurch der Kontrast zwischen markierten Bakterien und dem Hintergrund vermindert und damit die Auswertung erschwert. (Abb. 3.10).

3.2.3 Fluoreszenzlöschung zur Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz

In der Literatur sind verschiedene Protokolle zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz bei verschiedenen fluoreszenzbasierten Anwendungen wie der FISH beschrieben. Selten wurden dabei jedoch Untersuchungen mit klinischen Materialien durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Verfahren auf ihre Effektivität zur HF-Reduktion bei der Hybridisierung von CF-Sputum getestet. Die Auswertung der Präparate erfolgte dabei auf einer qualitativen Basis am Mikroskop bzw. über die digitalisierten Bilder (s. Abb. 3.6 – 3.13). Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der verschiedenen Protokolle zusammen.

Die Zugabe von Dextransulfat zum Hybridisierungspuffer wurde zur FISH-Diagnostik von bakteriellen DNS in phagozytischen Zellen und bei der Hybridisierung von Bakteriensuspensionen beschrieben (Matsuhisa *et al.*, 1994; Frischer *et al.*, 1996). Bei der Hybridisierung von CF-Sputum bewirkte Dextransulfat jedoch keine Reduktion der HF (s. Tab. 3.1).

Auch der Einsatz von Denhardts Lösung, die die Hybridisierung beschleunigen und verbessern soll, indem sie durch Volumeneinnahme im Puffer die Probe effektiv konzentriert sowie die unspezifische Bindung der Sonden blockiert (Denhardt, 1966; Sambrook *et al.*, 1989; Matsuhisa *et al.*, 1994), konnte keine deutliche Reduktion der HF von CF-Sputum erreichen.

Fung *et al.* (1998) beschrieben den Einsatz von Cystein, um unspezifische Bindungen der FISH-Sonden an freie Schwefelgruppen der im Probenmaterial vorhandenen Proteine zu verhindern. Da der Zusatz von 1,5mM Cystein zur Hybridisierungslösung einen positiven Effekt hatte, wurden auch höhere Konzentrationen bis zu 7,5mM mit und ohne Vorinkubation erprobt, um die optimale Dosierung zu finden. Beim Einsatz einer Cysteinkonzentration von 7,5mM und nach Vorinkubation von 60min zeigte sich eine deutliche Reduktion der Autofluoreszenz des Probenmaterials. Die Fluoreszenz der markierten Bakterien war unverändert, so dass sie vor dem weniger stark fluoreszierenden Hintergrund eindeutiger zu erkennen waren. Die fluoreszierenden Granula und Partikel blieben jedoch unverändert sichtbar (Abb. 3.11). Auch variierte die Effektivität dieser Methode stark zwischen verschiedenen Sputumproben.

Das ursprüngliche Acet-Anhydrid-Protokoll (s. Kapitel 2.2.1.3.2) erfordert eine dreistündige Vorinkubation der Präparate mit Denhardts Lösung. Dadurch löste sich

trotz Behandlung mit Gelatine häufig das Probenmaterial vom Objektträger und es konnte keine weitere Hybridisierung stattfinden. Durch eine verkürzte Inkubationszeit von einer Stunde wurde dieser Effekt zwar verhindert, die Verringerung der HF war trotz des aufwändigen Protokolls jedoch nur gering.

Aufbauend auf dem Konzept der ‚*molecular beacons*‘ (wörtlich übersetzt: molekulare Leuchtbaken), das auf der Unterdrückung der Fluoreszenz nicht hybridisierter Sondenmoleküle beruht, wurde ein weiterer Ansatz erprobt. Bei ‚*molecular beacons*‘ handelt es sich um haarnadelförmige Oligonukleotide, die an einem Ende ein Fluorophor, am anderen Ende einen ‚*Quencher*‘ (engl.: *to quench*: löschen) tragen. Durch die spezielle Form der Sonde liegen diese beiden Moleküle eng beisammen, wobei die Fluoreszenz des einen durch Energietransfer auf das andere Molekül unterdrückt wird. Bindet die Rundung dieser ‚Haarnadel‘ an die Zielsubstanz (DNS oder RNS), so öffnet sich das Oligonukleotid und die Fluoreszenz wird frei emittiert. (Tyagi *et al.*, 1996 und 1998; Tan *et al.*, 2000).

Dabsylchlorid (4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonylchlorid) wird aufgrund seiner absorbierenden Eigenschaften mit einem Maximum bei 425nm als ein solcher ‚*Quencher*‘ eingesetzt (Sato *et al.*, 1991). Beim Zusatz von freiem Dabsylchlorid zur Hybridisierungslösung zeigten sich deutliche Effekte bei der Unterdrückung der HF. Fluoreszierende Partikel sind kaum zu sehen, irrtümlich markierte Granula sind nur noch sehr gedämpft sichtbar, während die hybridisierten Bakterien unverändert gut erkennbar bleiben (Abb. 3.12).

Noch bessere Ergebnisse lassen sich mit dem Einsatz von freiem Biotin erreichen (Abb. 3.13). Biotin, ein Vitamin der B-Gruppe, dient als prosthetische Gruppe in Carboxylasen und Transcarboxylasen verschiedenster Organismen. Es besitzt außerdem eine hohe Affinität für eine große Anzahl anderer Proteine, mit denen es nicht-kovalente Bindungen eingeht. Rezeptoren für Biotin sind in allen Kompartimenten der Zelle, vom Plasma bis zum Nucleus, beschrieben (Bayer und Wilchek, 1990). Dieses Molekül kann daher mögliche unspezifische Bindungsstellen besetzen und damit unspezifische Fluoreszenz verhindern.

Aufgrund seiner guten Wirksamkeit auch in geringer Konzentration und bei nur kurzer Vorinkubation (30min) ist der Einsatz von Biotin bei der FISH von CF-Sputum zu empfehlen. Es hat zudem den Vorteil, ungiftig und sehr kostengünstig zu sein.

Beurteilungs- kriterium Protokoll	Bakterien sichtbar	Hintergrundfluoreszenz			Kontrast
		Autofluo- reszenz	fluores- zierende Granula	fluores- zierende Partikel	
nicht hybridisiert	-	++	(+)	+	-
Standard-FISH	+	++	+++	+++	+
unmarkierte Sonde BET42a	+	++	+++	+++	+
Acet-Anhydrid	+	++	++	++	+
Biotin	++	(+)	+	+	+++
Cy 5	+	+++	+	++	+
Cystein 1,5mM	+	++	+++	+++	+
Cystein 7,5mM	+	+	+++	+++	++
Dabsyl	++	(+)	+	+	+++
Denhardts Lösung	+	++	+++	+++	+
Dextransulfat 10%	+	++	+++	+++	+
Dextransulfat 10% + Cystein 1,5mM	+	++	+++	+++	+
Thymus-DNA	+	++	+++	+++	+

Tab. 3.1 : Zusammenfassung der mikroskopischen Auswertung der verschiedenen Protokolle zur Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz bei hybridisiertem Sputum. Die Hintergrundfluoreszenz unterteilt sich in die dem Material eigene Autofluoreszenz und die unspezifische Fluoreszenz, die als fluoreszierende Granula und Partikel nach der Hybridisierung in Erscheinung tritt. Mit Kontrast ist die Fluoreszenzstärke von spezifisch markierten Bakterien zu Hintergrundfluoreszenz bezeichnet. (+) = kaum sichtbar; + = sichtbar; ++ = gut sichtbar; +++ = sehr deutlich sichtbar

3.2.3.1 Überprüfung der Spezifität der FISH-Sonden

Jede Veränderung der Zusammensetzung der Hybridisierungslösung kann die Spezifität der FISH-Sonden beeinflussen und damit die Ergebnisse verfälschen. Um dieses auszuschließen, wurde bei den beiden effektivsten der oben getesteten Verfahren, dem Zusatz von Biotin und Dabsyl, die Bindungsspezifität der Oligonukleotidsonden überprüft.

Hierzu wurden PFA-fixierte Proben verschiedener Referenzorganismen (Zielorganismen der Sonden und ihnen nah verwandte Stämme) mit jeder der aufgeführten Sonden (s. Tab 3.2) und unter Zusatz von Biotin bzw. Dabsyl zur Hybridisierungslösung hybridisiert. Wie erwartet wurden alle Mikroorganismen durch die EUB-Sonde für *Eubacteriaceae* erkannt, während die anderen Sonden spezies-spezifisch für *P. aeruginosa*, *B. cepacia* und *S. maltophilia* blieben. Damit binden alle Sonden weiterhin hochspezifisch an die rRNA-Zielsequenzen der entsprechenden Zielorganismen unabhängig vom Zusatz von Dabsyl oder Biotin.

Es können also beide Stoffe leicht und effektiv zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes eingesetzt werden, ohne den spezies-spezifischen Nachweis zu beeinflussen, wobei sich Biotin aufgrund der etwas besseren Ergebnisse sowie der leichteren Handhabung empfiehlt.

Sonde \ Organismus	Eub338	PsaerB	Burcep	Stemal
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-	-
<i>P. fluorescens</i>	+	-	-	-
<i>P. putida</i>	+	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	+	-	-	-
<i>B. cepacia</i>	+	-	+	-
<i>S. maltophilia</i>	+	-	-	+

Tab. 3.2: Bindungsspezifität der Oligonukleotidsonden beim Zusatz von Dabsyl bzw. Biotin zur Hybridisierungslösung.

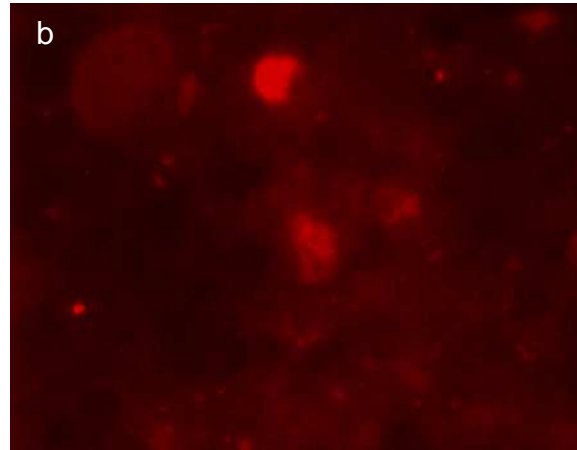
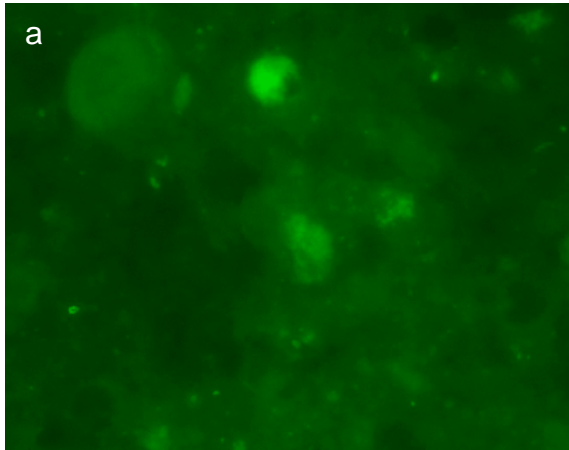


Abb. 3.6a, b: Natives Sputum unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Blaulicht (a; Anregung bei 450-490nm) und Grünlicht (b; Anregung bei 515-560nm) betrachtet. Man beachte die beträchtliche Autofluoreszenz des Materials.

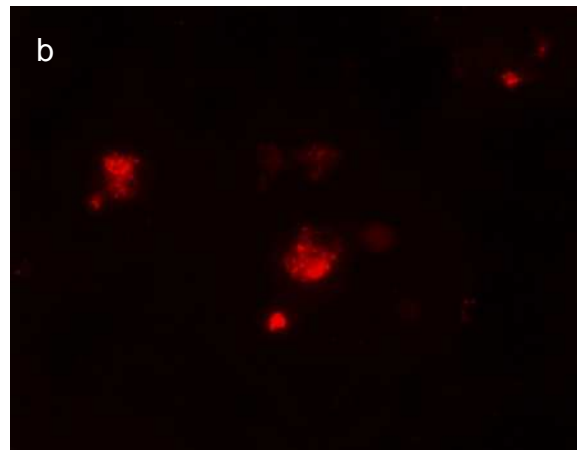
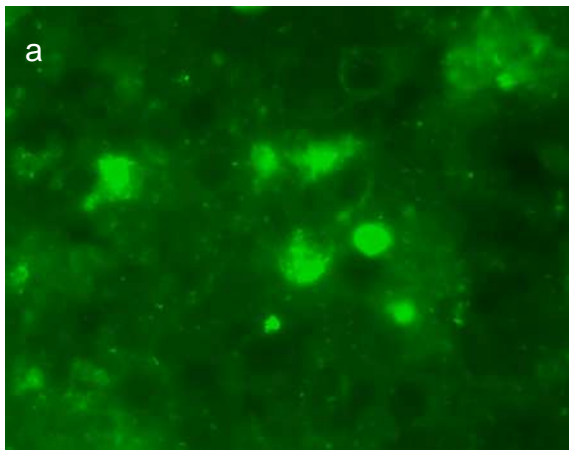


Abb. 3.7a,b: Sputum hybridisiert mit Fluoreszein-markierter Sonde EUB338 (a) und Cy3-markierter PsaerA (b). Viele fluoreszierende granulaähnliche Strukturen und Partikel erschweren die Auswertung.

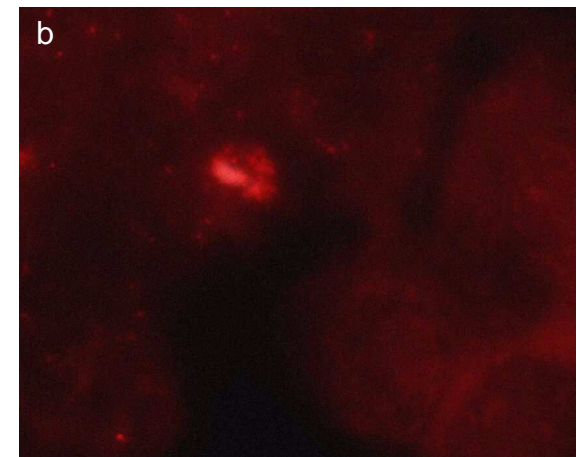
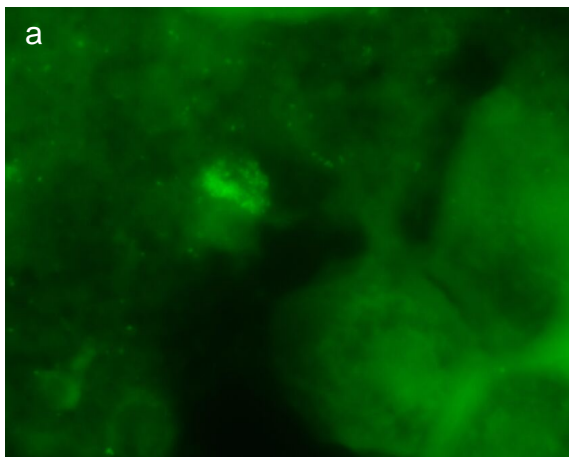


Abb. 3.8a,b: Sputum nur mit den Farbstoffen Fluorescein und Cy3 inkubiert, ohne Verwendung von Oligonukleotidsonden. Selbst bei diesem Verfahren fällt eine ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz auf, so dass eine unspezifische Bindung der Farbstoffe als Ursache in Frage kommt.

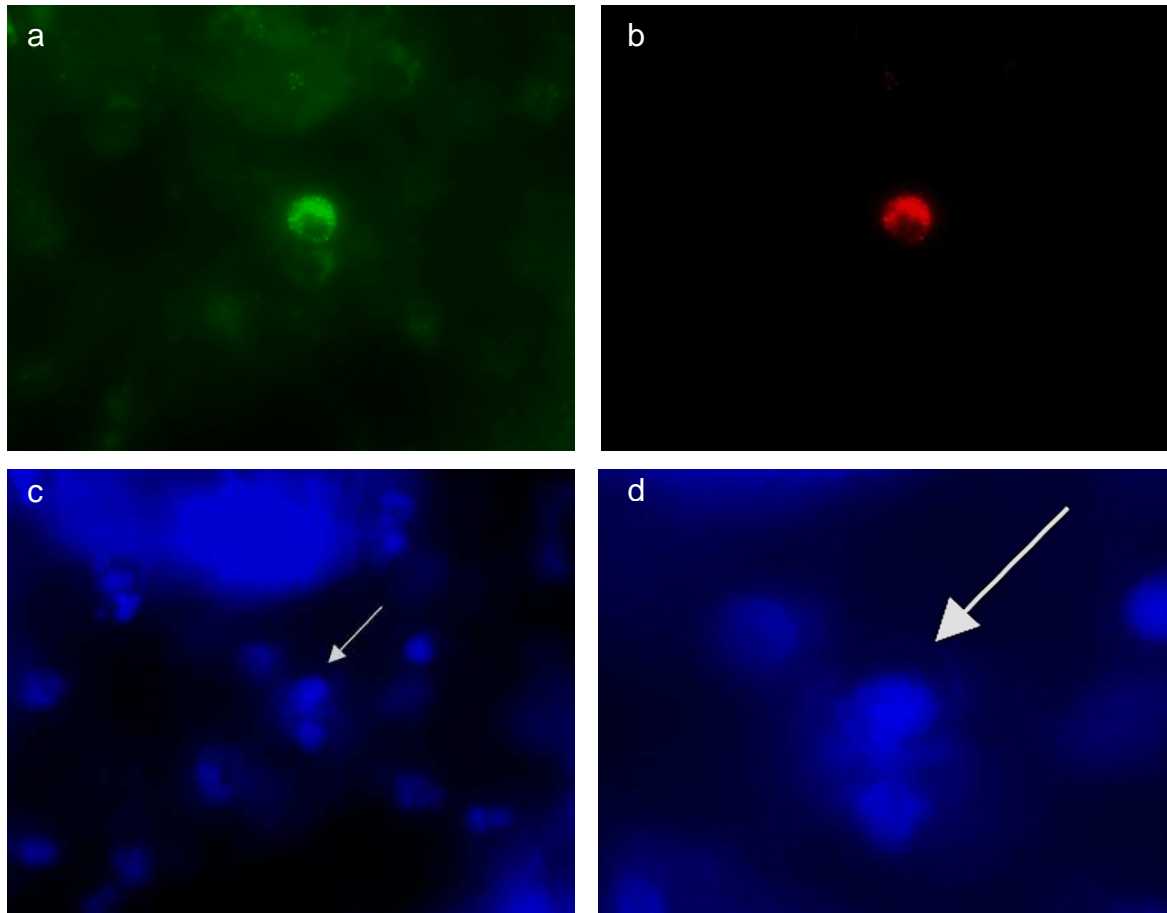


Abb. 3.9a-d: Sputum hybridisiert mit Fluoreszein-markierter EUB338 (a), Cy3-markierter PsaerA (b) und nach DAPI-Färbung zum Nachweis von DNS (c) mit Ausschnittsvergrößerung (d). Die Pfeile in c und d zeigen die Lokalsation der granulaähnlichen Fluoreszenz in a und b an, die sich in dieser Färbung schwarz darstellt, während die DNS des Zellkerns blau fluoresziert.

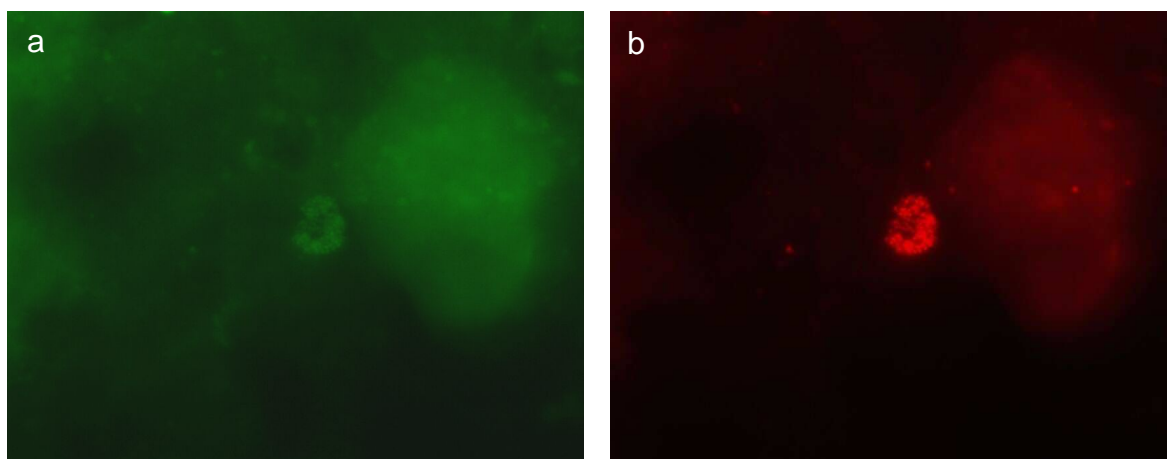


Abb. 3.10a,b: Es wurde versucht, die HF mit dem Cyanofarbstoff Cy5 zu blockieren. Die unspezifische Fluoreszenz erscheint abgeschwächt, jedoch liegt besonders im Rot-Filter ein roter Schleier über dem gesamten Präparat (b), der Kontrast zwischen fluoreszierenden Bakterien und dem Hintergrund ist weniger deutlich, was die Auswertung erschwert.

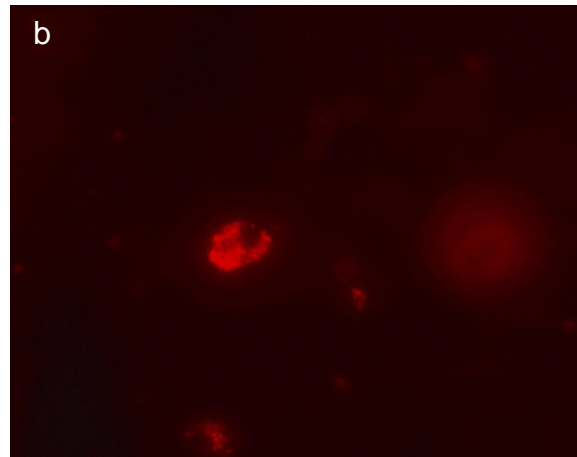
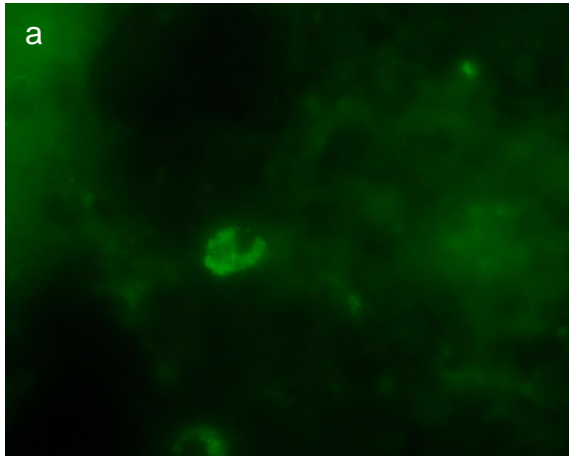


Abb. 3.11a,b: Nach Zugabe von Cystein in einer Konzentration von 7,5mM zur Hybridisierungslösung und einer Inkubationszeit von 60min vor der Zugabe der Sonden zeigt sich eine Verminderung der Autofluoreszenz des Sputums. Fluoreszierende Granula und Partikel sind aber unverändert zu erkennen.

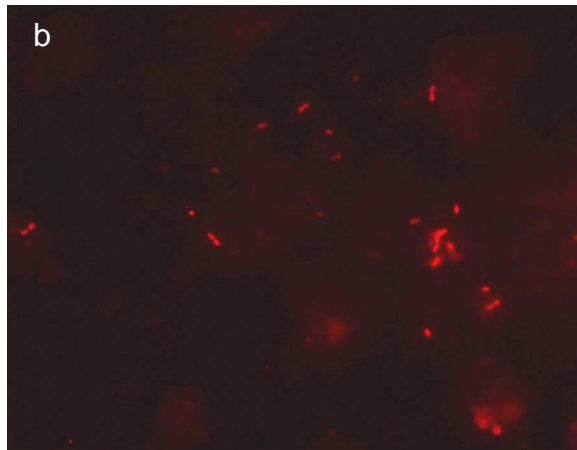
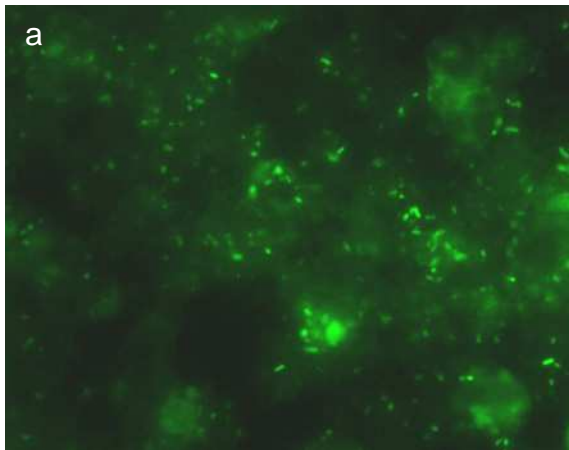


Abb. 3.12a,b: Gute Unterdrückung der HF bei der Zugabe des Quenchers Dabsylchlorid zur Hybridisierungslösung.

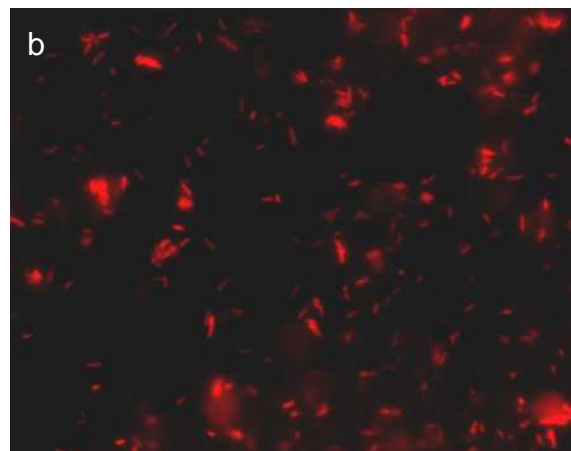
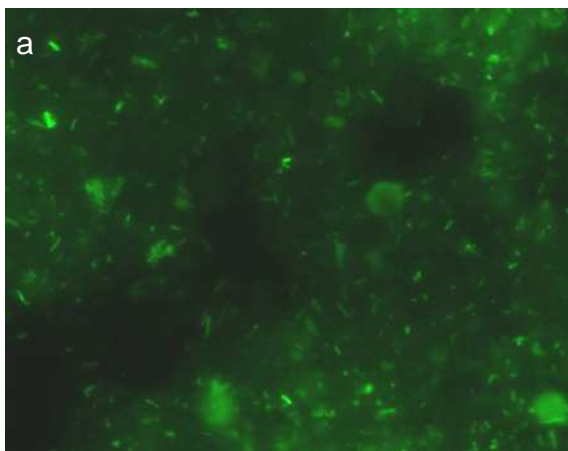


Abb. 3.13a,b: Deutlichere Verbesserung der Hybridisierungsergebnisse bei der Verwendung von Biotin. Fluoreszierende Partikel sind kaum zu sehen, irrtümlich markierte Granula nur gedämpft sichtbar, während hybridisierte Bakterien unverändert gut erkennbar bleiben.

3.3 Quantitativer Erregernachweis in Sputumproben von CF-Patienten mittels FISH-basierter Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle und effiziente Methode zum spezifischen und quantitativen Nachweis verschiedener Zellpopulationen (z.B. T-Zellen, B-Zellen u.a.) in der Immunologie, Hämatonkologie und Infektionsbiologie. Obwohl sie hauptsächlich zur Messung eukaryoter Zellen verwendet wird, gibt es durch die ständige Verbesserung der Messtechnik auch eine wachsende Anzahl von Anwendungen im mikrobiologisch-diagnostischen Bereich, v.a. in der Umweltbiologie und der Nahrungsmittelüberwachung (Patchett *et al.*, 1991; Davey and Kell, 1996; Williams *et al.*, 1999; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Sincock and Robinson, 2001; Bunthof and Abee, 2002; Mueller *et al.*, 2006). Besonders der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen hat sich als wichtiges Element zum sensitiven Nachweis von Mikroorganismen etabliert (Davey and Kell, 1996). Im Gegensatz zur Kultur und zur mikroskopischen Auszählung von Bakterien liefert die Durchflusszytometrie schnell und untersucherunabhängig quantitative Ergebnisse (Williams *et al.*, 1999; Bunthof and Abee, 2002; Wagner *et al.*, 2003).

Bei den meisten Anwendungen wird die Fluoreszenzmarkierung entweder direkt, z.B. mit den Nukleinsäurefarbstoffen DAPI oder Ethidiumbromid, bzw. über Antikörper erreicht (Davey and Kell, 1996; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000). Weniger häufig wurde die FISH zusammen mit der Durchflusszytometrie eingesetzt (Amann *et al.*, 1990a; Simon *et al.*, 1995; Wallner *et al.*, 1993 und 1997). Darüber hinaus wurden beide Methoden erfolgreich auch zur Untersuchung von klinischen Materialien, vornehmlich Stuhlproben, kombiniert (van der Waaij *et al.*, 1994; Zoetendal *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2006). Neben der qualitativen Diagnostik, dem Nachweis der Erreger im Untersuchungsmaterial, kann dabei auch eine quantitative Aussage über die Anzahl der Erreger und bei Mehrfachinfektionen auch über das Mengenverhältnis der Erreger zueinander getroffen werden.

Auch Sputum und bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wurden in der Vergangenheit zytometrisch ausgewertet, allerdings primär zur Bestimmung der Lymphozytenzahl (Birring *et al.*, 2003; Leckie *et al.*, 2003). Eine mikrobiologische Auswertung zur Bestimmung der Bakterienlast in respiratorischen Materialien ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kombination von FISH und Durchflusszytometrie zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Erregern aus CF-Sputum zu etablieren.

3.3.1 Quantitativer Nachweis von *in vitro* kultivierten Mikroorganismen mittels FISH: Anpassung der Standard-FISH

Zur qualitativen und quantitativen Detektion von Bakterien mittels FISH im Durchflusszytometer müssen die Proben in Suspension vorliegen. Hierzu musste die beschriebene Standard-FISH zur Hybridisierung von auf Objektträgern immobilisierten Bakterien (OT-FISH) in einem ersten Schritt entsprechend modifiziert werden.

Zunächst wurde gezeigt, dass die typischen gramnegativen Erreger bei CF, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *B. cepacia*-Komplex und *S. maltophilia*, nach der Hybridisierung im Flüssigansatz mit spezifischen Fluorescein-markierten Sonden (siehe Tab. 2.1) zytometrisch identifiziert werden konnten (Abb. 3.15 auf S. 63 zeigt die Ergebnisse für *P. aeruginosa*, die Ergebnisse für die weiteren Spezies entsprechen diesen, sind hier jedoch nicht angeführt). Die klar umrissene Zellpopulation in Histogramm 3.14a, in dem ‚forward‘- gegen ‚sideward-scatter‘ aufgetragen ist, zeigt in Histogramm 3.14c eine deutliche Fluoreszenz und kann damit eindeutig als *P. aeruginosa* identifiziert werden.

Als wichtigster Vertreter der grampositiven Bakterien bei CF wurden Messungen mit *S. aureus* durchgeführt. Diese erbrachten jedoch sehr unterschiedliche quantitative Ergebnisse. Zur Kontrolle wurden die hybridisierten Proben mit einer DNS-Färbung (DAPI) gegengefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Es zeigte sich zum einen, dass ein Teil der Erreger als Haufenkokken vorlag, also ungenügend vereinzelt war, was bedeutet, dass jedes dieser Cluster im Durchflusszytometer als nur ein fluoreszierender Partikel gemessen wird. Zum anderen wurde bei der Hybridisierung in Lösung nur ein Teil der vorhandenen Staphylokokken mit Fluorescein markiert. Dieses legte den Schluss nahe, dass der Verdau der Zellwand durch Lysozym und Lysostaphin in Lösung nur unvollständig war, so dass die Oligonukleotidsonden nicht in alle Bakterienzellen eindringen konnten. Trotz Verdoppelung von Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten konnten nur etwa 50% der Bakterien hybridisiert werden. Die Kombination von FISH und

Durchflusszytometrie ist demnach zum Nachweis von *S. aureus* nur bedingt geeignet, da die Sensitivität deutlich eingeschränkt ist und keine verlässlichen quantitativen Aussagen getroffen werden können.

3.3.1.1 Quantifizierung von Erregermengen: Vergleich von OT-FISH und Suspensions-FISH

Um zu bestimmen, ob und ggf. in welchem Ausmaß beim modifizierten FISH-Protokoll in Lösung (Suspensions-FISH) im Vergleich zur OT-FISH durch die notwendigen Wasch- und Zentrifugationsschritte Bakterienzellen verloren gehen, wurde ein Teil der Probe auf dem Objektträger, der andere Teil in Suspension hybridisiert. Die Lösung wurde nach erfolgter Suspensions-FISH auf Objektträger aufgetropft und ebenfalls unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass die Keimzahl nach der Flüssighybridisierung wesentlich geringer ist. Zur Quantifizierung des Verlustes an Probenmaterial, wurden Vergleichsmessungen vor und nach Zentrifugation durchgeführt. Dabei wurden mit dem Fluorometer und dem Durchflusszytometer zwei unabhängige Messmethoden verwendet, um die Validität der Ergebnisse abzusichern

Dass die mit beiden Methoden erhobenen Daten sehr gut korrelieren, wurde im Vorfeld nachgewiesen, indem die Verdünnungsreihe einer Suspension aus hybridisierten *P. aeruginosa* (Fluorescein-markierte Sonden PsaerA und PsaerB) parallel flourophotometrisch und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Tabelle 3.3 stellt repräsentativ eine von drei durchgeführten Messreihen dar, die mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen durchgeführt wurden. Wie ersichtlich korrelieren die mit beiden Messtechniken ermittelten relativen Erregermengen sehr gut (Korrelationskoeffizient 0,9998).

Verdünnung	Fluoreszenz	Zellzahl/ μ l
1:1	5,99	23093
1:2	2,92	11065
1:4	1,52	5585
1:8	0,87	2910
1:10	0,68	2578

Tab. 3.3: Messung von Fluoreszenzintensität mittels Fluorometer bzw. Bakterienzahl (im Durchflusszytometer) der Verdünnungsreihe einer Suspension FISH-markierter *P.aeruginosa*.

Zur Berechnung des Probenverlustes bei der Flüssig-FISH wurde eine Suspension von Fluorescein-markierten *P. aeruginosa* (Sonden PsaerA und PsaerB), als Vertreter der gramnegativen, CF-typischen Bakterien, in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde unbehandelt der Messung zugeführt und diente als Ausgangswert, mit dem anderen wurde vor der Messung die Anzahl der in der Flüssighybridisierung benötigten Zentrifugationsschritte durchgeführt. Fluoreszenz und Keimzahl/μl wurden parallel an jeweils fünf Proben gemessen. Jede der fünf Proben wurde im Fluorometer dreimal gemessen, aus den einzelnen Werten wurde dann der Mittelwert errechnet. Im Durchflusszytometer wurden jeweils zwei Messungen derselben Probe gemittelt. Der endgültige Wert entspricht dem Mittelwert der Ergebnisse der fünf Proben (s. Tab.3.4).

Im Fluorometer entspricht der nach Zentrifugation gemessene Anteil 39,46% des Ausgangswertes, während ein Anteil von 37,86% im Durchflusszytometer bestimmt wurde.

Der Verlust an Probenmaterial nach Suspensions-FISH beträgt also etwa 60%. Dieser Anteil ist zwar stabil und kann somit als Berechnungsgrundlage für absolute Keimzahlen genommen werden. Es bleibt jedoch zu beachten, dass ein solch hoher Verlust bei der Auswertung von klinischen Proben, die möglicherweise nur sehr geringe Keimzahlen beinhalten, die Sensitivität des Erregernachweises stark beeinträchtigt. Dennoch wurde die Durchführbarkeit dieser Methode mit CF-Sputum erprobt.

A*Spektrometer*

Ausgangswert

Messung \ Probe	1	2	3	4	5
A	6,04	6,12	5,95	5,91	6,03
B	6,07	5,83	6,03	5,95	6,04
C	6,04	5,89	6,07	5,95	6,04
Mittelwert	6,05	5,95	6,02	5,94	6,04

5,99 ($\pm 0,079$) =100%

nach Zentrifugation

Messung \ Probe	1	2	3	4	5
A	2,42	1,84	2,05	3,01	2,49
B	2,37	1,87	2,18	3,01	2,57
C	2,39	1,82	2,13	3,01	2,49
Mittelwert	2,39	1,843	2,12	3,01	2,52

2,37 ($\pm 0,408$) =39,46%**B***Zytometer*

Ausgangswert

Messung \ Probe	1	2	3	4	5
A	5536	5022	5733	6802	5770
B	5455	4852	5669	6558	5415
Mittelwert	5496	4937	5701	6680	5593

5681 ($\pm 605,6$) =100%

nach Zentrifugation

Messung \ Probe	1	2	3	4	5
A	2390	1595	2046	2259	2542
B	2358	1616	2108	2069	2527
Mittelwert	2374	1606	2077	2164	2535

2151 ($\pm 336,8$) =37,86%

Tab. 3.4: Bestimmung der Fluoreszenzintensität und der Keimzahl einer Suspension von *P. aeruginosa* nach Suspensions-FISH mit den Fluorescein-markierten Sonden *PsaerA* und *PsaerB* vor und nach Zentrifugation. **A** Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels Fluorometer. Fünf Proben wurden jeweils dreimal gemessen und die Ergebnisse gemittelt. **B** Messung der Keimzahl im Durchflusszytometer. Fünf Proben wurden jeweils zweimal gemessen und die Werte gemittelt.

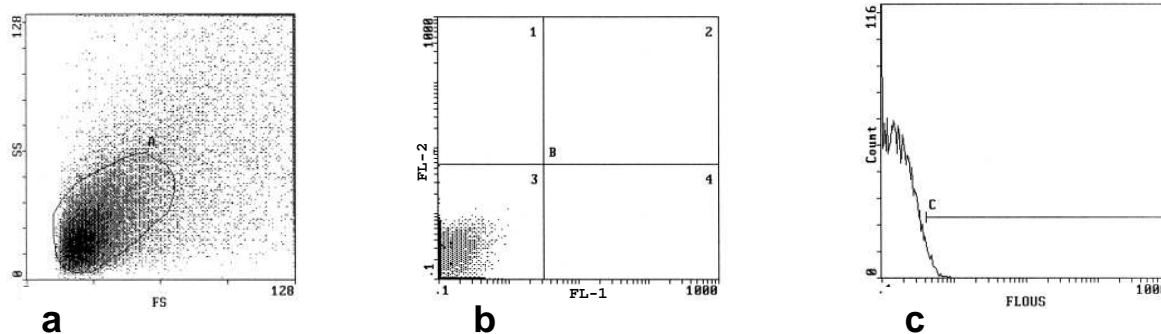
3.3.2 Messung von Sputum im Durchflusszytometer

Es wurde bisher gezeigt, dass sich gramnegative Bakterien aus Reinkultur nach FISH in Suspension mit dem Durchflusszytometer hinsichtlich Bakterienzahl und Fluoreszenzintensität charakterisieren lassen. Ziel dieser Arbeit war es weiter, die automatisierte FISH-Auswertung von CF-Sputum mittels Durchflusszytometrie zu erproben.

Führt man eine durchflusszytometrische Messung mit nativem Sputum durch, so zeigt das Histogramm des ‚*forward-sideward-scatters*‘ eine große Streuung über den gesamten Messbereich (Abb. 3.14a). Grund hierfür ist die inhomogene Zusammensetzung und die unregelmäßige Konsistenz des untersuchten Materials, dessen Partikel unterschiedlichster Größe das Licht des exzitatorischen Lasers breit streuen (s. Kap. 2.2.2.2). Das Fluoreszenzsignal des nativen Sputums (Autofluoreszenz) ist bei anregendem Licht der Wellenlänge 488nm allerdings gering (Abb. 3.14c).

Bei diesem ausgeprägten Hintergrundrauschen in der Darstellung der Lichtstreuung war es entsprechend schwierig, einzelne Bakterienpopulationen aufgrund ihrer Größe im ‚*forward-sideward-scatter*‘ abzugrenzen. Eine Unterscheidung durch das Fluoreszenzsignal war jedoch möglich (Abb. 3.16c).

Mischt man natives Sputum mit FISH-markierten *P. aeruginosa*-Zellen, so lassen sich die Mikroorganismen im ‚*forward-sideward-scatter*‘ nicht als eigenständige Population darstellen. Im Vergleich zu Sputum ohne Zusatz wird jedoch ein Fluoreszenzsignal mit deutlichem Peak registriert (s. Abb. 3.16 auf S. 64). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass fluoreszierende Bakterien in der Probe vorhanden sind. Allerdings ist die Anzahl der gezählten fluoreszierenden Ereignisse um etwa 20% geringer als bei Messung der äquivalenten Menge FISH-markierter *P. aeruginosa* in PBS (Abb. 3.15). Diesem könnten entweder fluoreszenzlöschende Eigenschaften des Sputums oder aber eine Aggregation der Bakterien, die dann nur als ein fluoreszierendes Ereignis gezählt werden, zu Grunde liegen.

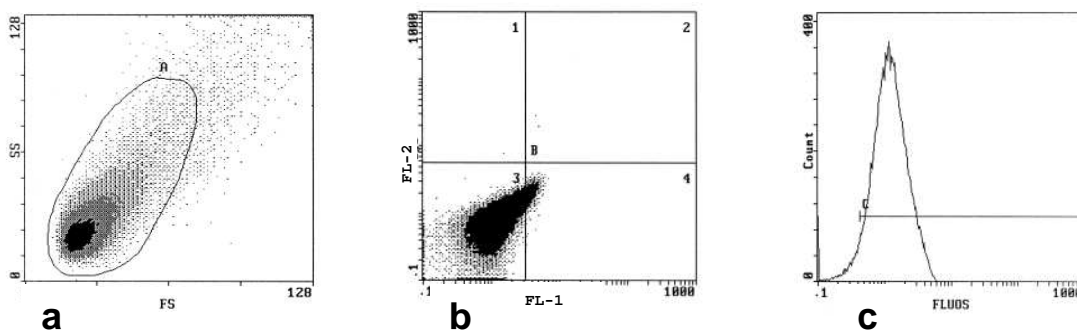


Region ID	%	Count	MnI X	MnI Y
A A	54.6	26303	33.0	25.1
B1 B	0.00	1	0.106	14.2
B2 B	0.00	0	****	****
B3 B	100	26302	0.139	0.199
B4 B	0.00	0	****	****

Region ID	%	Count	Min	Max	MnI X
C C	1.37	360	0.424	1024	0.524
D D	1.36	357	0.653	944.4	0.827

d

Abb. 3.14a - d: Bestimmung der Fluoreszenzintensität von nativem Sputum mittels Durchflusszytometrie (FL1-Kanal = 525nm Wellenlänge). In Histogramm a ist der ,forward'- gegen den ,sideward-scatter' aufgetragen, es wird also die Verteilung der Partikel anhand von Größe und der daraus bedingten Lichtreflektion dargestellt. Die mit ,a' bezeichnete Linie umschließt den Bereich (= ,Gate'), in dem sich die Population von *P. aeruginosa* befinden soll (wie in Abb. 3.15a gezeigt). Histogramm b zeigt die Fluoreszenz zweier verschiedener Wellenlängen (525nm und 575nm) der im Bereich a eingeschlossenen Partikel. Histogramm c stellt die absolute Anzahl der fluoreszierenden Partikel dar, die sich in Gate a befinden. Außerhalb des Bereiches c (in Histogramm c) liegt die Eigenfluoreszenz des Sputums. Tabelle d gibt die absoluten Zahlen der Messwerte der einzelnen Gates an.



Region ID	%	Count	MnI X	MnI Y
A A	94.1	53376	31.5	30.3
B1 B	0.01	5	2.13	6.63
B2 B	0.01	4	4.42	17.6
B3 B	94.5	50444	1.31	0.838
B4 B	5.48	2923	4.01	2.12

Region ID	%	Count	Min	Max	MnI X
C C	94.9	50644	0.432	1024	1.52
D D	49.9	26617	0.810	996.7	1.32

d

Abb. 3.15a - d: Zytometrische Registrierung von *P. aeruginosa* (mit Fluoreszein-markierten Sonden PsaeA und PsaeB hybridisiert) in PBS. Die Bakterienpopulation stellt sich eindeutig in Histogramm a dar. Histogramm c zeigt die deutliche Fluoreszenz der Organismen.

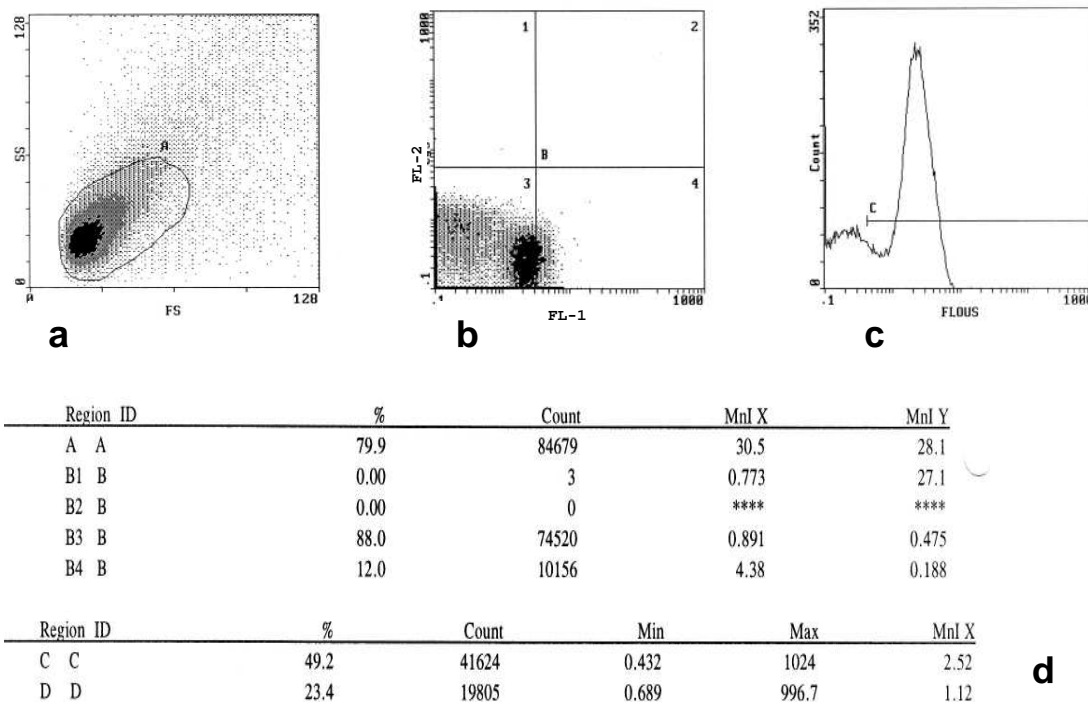


Abb. 3.16a - d: Nativem Sputum wurden vor der Messung hybridisierte *P. aeruginosa* zugesetzt. Während die Bakterien in Histogramm a nicht als eigene Population zu erkennen sind, grenzt sich ihr Fluoreszenz-Peak in Histogramm c deutlich gegen die Autofluoreszenz des Sputums ab.

Hybridisiert man eine *P. aeruginosa*-positive Sputumprobe in Lösung, so werden im Durchflusszytometer sehr viel weniger fluoreszierende Ereignisse gezählt, als nach Auszählung derselben Probe unter dem Mikroskop zu erwarten wäre (s. Abb. 3.18). Um dieses weiter zu überprüfen, wurden nativem Sputum vor der Hybridisierung unmarkierte *P. aeruginosa* aus Reinkultur zugesetzt. Diese Probe wurde sowohl auf dem OT als auch in Flüssigmedium hybridisiert und entsprechend mikroskopisch und im Durchflusszytometer ausgewertet. Bei der zytometrischen Messung ist die Anzahl der gezählten fluoreszierenden Ereignisse geringer als in der mikroskopischen Auszählung (s. Abb. 3.17). Allerdings lassen sich unter dem Mikroskop immer wieder Bakterienhaufen beobachten, die bei fehlender Vereinzelung als nur ein fluoreszierendes Ereignis im Durchflusszytometer gezählt würden.

Eine qualitative Auswertung der klinischen Sputumproben ist demnach möglich, das Vorhandensein fluoreszierender, gramnegativer Bakterien lässt sich nachweisen. Es lassen sich jedoch wegen der inhomogenen Probenbeschaffenheit und der fehlenden Vereinzelung der Erreger keine reproduzierbar quantitativen Aussagen treffen.

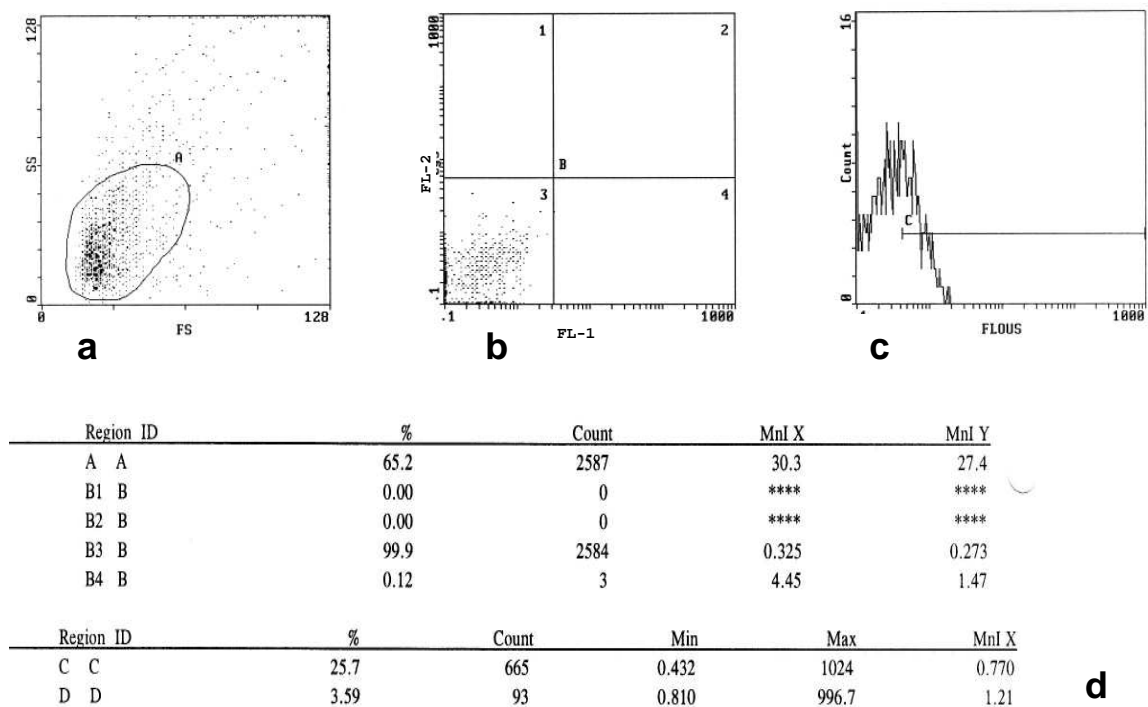


Abb. 3.17: Unmarkierte *P.aeruginosa* wurden nativem Sputum vor der Hybridisierung zugesetzt. In Histogramm c wird Fluoreszenz gemessen, die sich jedoch nicht als deutlicher Peak von der Autofluoreszenz des Sputums differenzieren lässt.

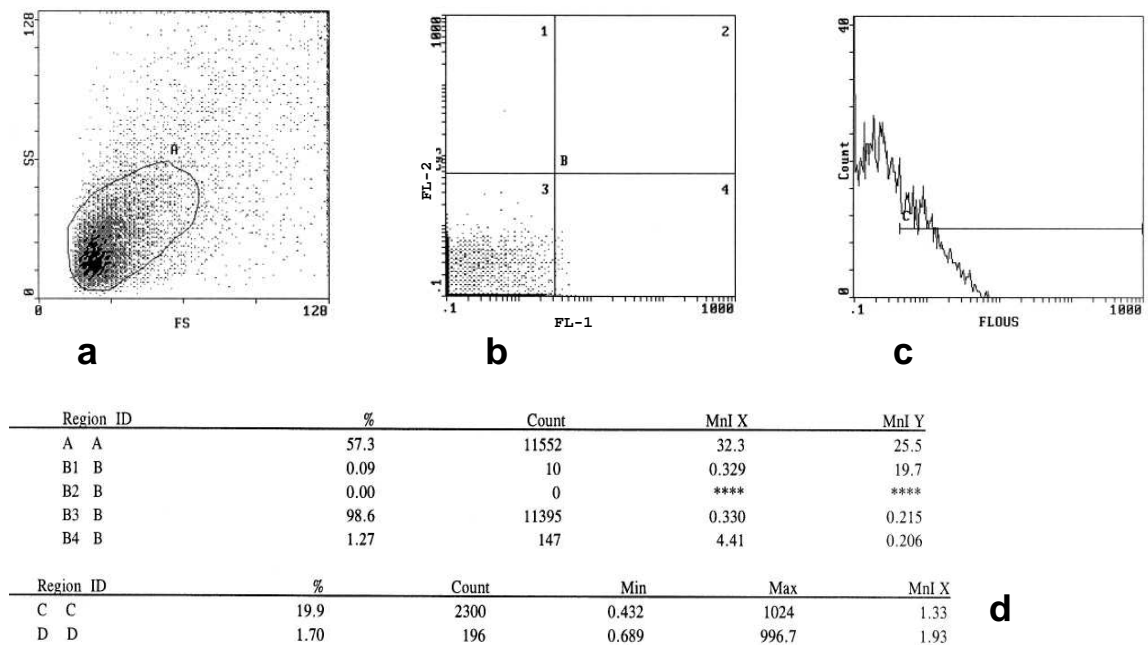


Abb. 3.18: FISH-markiertes Sputum. In Histogramm a lässt sich keine Bakterienpopulation vom Hintergrund des Materials abgrenzen. Histogramm c zeigt eine schwache Schulter für die Fluoreszenz der Bakterien.

3.3.3 Abgrenzung zweier Bakterienpopulationen im Durchflusszytometer

Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe für die FISH-Sonden unterschiedlicher Spezifität ist in der Durchflusszytometrie die Unterscheidung mehrerer Bakterienpopulationen in derselben Probe möglich (Wallner *et al.*, 1997).

Dieses erfordert Farbstoffe, die bei derselben Wellenlänge angeregt werden, dann aber Licht verschiedener Wellenlänge emittieren. Alternativ benötigt man ein Durchflusszytometer mit anregenden Lasern verschiedener Wellenlänge.

Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL besitzt einen Laser, der Licht der Wellenlänge 488nm generiert. Dieses ist ideal für die Verwendung des Farbstoffes Fluorescein, dessen Absorptionsmaximum bei 494nm liegt. Alle bisherigen Messungen wurden daher mit diesem Farbstoff durchgeführt. Zur Abgrenzung zweier verschiedener Bakterienpopulationen in derselben Probe ist jedoch ein zweiter Farbstoff erforderlich. Der bei der OT-FISH gebrauchte Cyanofarbstoff Cy3, der Licht der Wellenlänge 570nm emittiert und damit von Fluorescein mit seinem Emissionsmaximum von 518nm gut zu unterscheiden ist, wird nicht bei 488nm angeregt.

PC5 ist ein Farbstoff, der vielfach in der Durchflusszytometrie verwendet wird, mit einem Absorptionsmaximum von 488nm und einer maximalen Emission von 670nm. Dieser wird jedoch nicht in direkter Bindung an das Oligonukleotid der Sonde angeboten, sondern bindet über einen Streptavidinanteil an das mit Biotin markierte Oligonukleotid. Probeweise Hybridisierungen wurden sowohl mit der biotinylierten Sonde und nachträglicher Zugabe des farbstoffmarkierten Streptavidins als auch mit dem vorformierten Komplex aus Sonde, Biotin, Streptavidin und Farbstoff durchgeführt. Die Proben wurden auf dem Objektträger und im Durchflusszytometer ausgewertet, zeigten jedoch keine Fluoreszenz der Bakterien. Da diese Markierung für den Gebrauch mit eukaryoten Zellen entwickelt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die bakterielle Membran nicht durchlässig genug ist für den großen Komplex aus Streptavidin (60 kD) und Farbstoff (Hollinshead *et al.*, 1997).

Die für diese Arbeit vorhandenen technischen Möglichkeiten erlauben also den qualitativen Nachweis von gramnegativen Bakterien in Sputum, es können jedoch nicht zwei Erreger in derselben Probe differenziert werden.

4 Diskussion

Die Zystische Fibrose ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung. Während die kausale Therapie der ursächlichen Genmutation weiterhin Gegenstand der Forschung ist (Griesenbach *et al.*, 2006; Anson *et al.*, 2006), konnte die durchschnittliche Lebenserwartung der Patienten durch zahlreiche Verbesserungen der symptomatischen Therapieformen auf über 35 Jahre im Jahr 2005 angehoben werden (*CF Foundation Annual Patient Registry Data Report* 2005). Lebenslimitierend für CF-Patienten sind auch heute noch meist die Infektionen der unteren Atemwege, die zu fortschreitender pulmonaler Insuffizienz führen (Koch and Hoiby, 2000). Das sehr viskose Bronchialsekret der CF-Lunge wird durch ein beschränktes Spektrum an CF-typischen Erregern, allen voran *P. aeruginosa*, besiedelt, wobei sich – auch unter chronischer Besiedelung – Zeiten des relativen Wohlbefindens mit akuten Exazerbationen abwechseln (Govan and Deretic, 1996). Im Rahmen der chronischen Pneumonie und verstärkt in jeder akuten Infektionsphase wird das Lungenparenchym durch eine überschießende inflammatorische Reaktion mit Ausschüttung von Elastasen, Myeloperoxidase und reaktiven Sauerstoffmetaboliten geschädigt und damit die Lungenfunktion zunehmend verschlechtert (Goldstein, 1986; Birrer, 1994). Um diesem entgegenzuwirken, ist das vordringliche Ziel der Therapie, den auslösenden Erreger möglichst früh zu identifizieren und mit wirksamen Antibiotika zu behandeln, so dass die Gewebeschädigung möglichst gering gehalten wird.

Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik basierend auf Kultivierung der bakteriellen Erreger auf festen Nährböden, der anschließenden Isolation und Identifikation einzelner Mikroorganismen über Stoffwechselreaktionen benötigt i.d.R. 48h bis zu 96h und für biochemisch inaktive Nonfermenter sogar länger (Hogardt *et al.*, 2000). Weiter verlängern lange Transportwege der Untersuchungsmaterialien zu den mikrobiologischen Laboren die Zeit bis zur Diagnose unnötig. Durch suboptimale Lagerungsbedingungen sowie die Kulturbedingungen der Routinediagnostik kann es zu Überwucherungen langsamer wachsender Spezies kommen, so dass die Kulturergebnisse nicht immer den mikrobiellen Verhältnissen in der Lunge entsprechen (Wagner, 1995; van Belkum *et al.*, 2000). Zur optimalen Versorgung der Patienten ist daher eine Nachweismethode erstrebenswert, die innerhalb kurzer Zeit mit hoher Spezifität und Sensitivität einen Erregernachweis liefert.

4.1 Molekularbiologische Nachweismethoden in der Bakteriologie

Im letzten Jahrzehnt haben molekulare Nachweisverfahren die Infektionsdiagnostik wesentlich verändert. Der Goldstandard der mikrobiologisch-bakteriologischen Diagnostik bleibt weiterhin der kulturelle Nachweis der Erreger dank der einfachen Durchführbarkeit, der hohen Sensitivität und der geringen Kosten (Stender *et al.*, 2002). Außerdem ist für die meisten Antibiotika nur nach kultureller Erregeranzucht eine Prüfung auf deren Empfindlichkeit möglich. Andererseits werden jedoch ausschließlich stoffwechselstabile Organismen nachgewiesen, die sich auf dem angebotenen Nährmedium vermehren können. Des weiteren können, wie in dieser Arbeit aufgezeigt, Transport- und Lagerungsbedingungen großen Einfluß auf die Erregermenge nehmen, so dass die Kulturergebnisse nicht unweigerlich die Menge und Zusammensetzung der Organismen in der Lunge repräsentieren. Idealerweise sollten Sputumproben zur kulturellen Diagnostik gekühlt verschickt, möglichst sofort und mit größter Sorgfalt weiterverarbeitet werden, um nach Desintegration von Erregerzellaggregaten eine zuverlässige Keimzahlbestimmung zu garantieren. Selbst unter solchen optimalen Bedingungen dauert eine vollständige Analyse mindestens 48h, wertvolle Zeit, die der erregerspezifischen Behandlung verloren geht.

Der Bestimmung der wahren Keimzahl von mit Antibiotika anbehandelten Bakterien durch Kultivierung auf festen Nährböden ist unmöglich. In dem durchgeführten Experiment waren bereits nach einer Stunde Inkubation in Ciprofloxacin-haltigem Nährmedium keine Organismen mehr kultivierbar. Es wäre jedoch wünschenswert, auch nach der aufgrund klinischer Symptome begonnenen empirischen Antibiotikagabe, den Erreger der Lungeninfektion identifizieren zu können, um ggf. die Therapie zu optimieren.

Als Alternative zum kulturellen Nachweis wurde in dieser Arbeit die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erprobt. Wie bereits in der Einleitung erläutert, basiert diese Technik auf der Analyse von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe Mikroorganismen gattungs- und artspezifisch identifiziert werden können. Mit Nukleinsäureamplifikationstechniken wie der PCR kann auch eine sehr geringe Anzahl von Mikroorganismen nachgewiesen und mit entsprechenden Primern auch die Komplexität bakterieller Populationen in natürlichen Habitaten (Weidner *et al.*, 1996; Glockner *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006; Takaku *et al.*, 2006) oder bei klinischen Krankheitsbildern, wie z.B. dentalen Abszessen, Paradontitis, nekrotisierender Enterocolitis und anderen gastrointestinalen Erkrankungen (Dymock

et al., 1996; Millar *et al.*, 1996; Apajalahti *et al.*, 2003; de Lillo *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2005) dargestellt werden. Doch erst durch die Einführung der *in situ* Nachweismethoden mit radioaktiv oder fluoreszenzmarkierten, gegen die ribosomale RNS (rRNS) gerichteten Oligonukleotidsonden, konnten ganze Bakterienzellen identifiziert und unter dem Epifluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (Giovannoni *et al.*, 1988; DeLong *et al.*, 1989). Diese Technik wurde zunächst hauptsächlich in der Umweltmikrobiologie bei der Untersuchung von Wasser- und Bodenproben eingesetzt (Wagner *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 1996; Felske *et al.*, 1998; Llobet-Brossa *et al.*, 1998). Die FISH-Technik kann auch in der medizinischen Mikrobiologie eingesetzt werden. Als schnelle Diagnostik bei lebensbedrohlichen Krankheitsbildern wie z.B. Sepsis (Kempf *et al.*, 2000; Fazii *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2005; Kempf *et al.*, 2005; Søgaaard *et al.*, 2005), nekrotisierender Faszitis, *toxic shock* Syndrom durch A-Streptokokken (Trebesius *et al.*, 2000) und Meningitis (Fazii *et al.*, 2002; Poppert *et al.*, 2005) kann zeitnah der Erreger identifiziert und eine auf den Zielorganismus abgestimmte, empirische Antibiotikatherapie begonnen werden.

Des Weiteren kann die FISH zum Nachweis langsam wachsender und schwer kultivierbarer Bakterien eingesetzt werden, so z.B. für *Chlamydia* in verschiedenen Probenmaterialien (Poppert *et al.*, 2002; Kapur *et al.*, 2006), Mykobakterien (Stender *et al.*, 1999), *Legionella* aus Bronchial- (Hu *et al.*, 2002) und *H. pylori* aus Magenbiopsien (Rüssmann *et al.* 2001a). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach Antibiotikaexposition mit der FISH bakterielle Erreger im Vergleich zur Kultur deutlich länger, d.h. noch bis zu 72h lang nachgewiesen werden konnten. Eine Beobachtung, die bereits von anderen Autoren gemacht wurde (Hogardt *et al.*, 2000; Trebesius *et al.*, 2000).

Aus der Diskrepanz zwischen Kultur- und FISH-Ergebnissen hat sich eine weitreichende Diskussion darüber entwickelt, wann ein Organismus noch als lebensfähig bezeichnet wird. Die klassische Bakteriologie gibt die Fähigkeit, auf Nährmedium eine Kolonie zu bilden, als Definition für Leben an (Postgate, 1976). Andererseits gibt es Organismen, die je nach Stoffwechsellage und dem angebotenen Nährmedium gar nicht oder nur sehr langsam wachsen, allen voran Mykobakterien (Davey and Kell, 1996; Oda *et al.*, 2000). Molekularbiologische Nachweismethoden zeigen das Vorhandensein von Nukleinsäuren an, ohne jedoch zu wissen, ob der dazugehörige Organismus intakt und lebensfähig ist. Ribosomale

RNS gilt jedoch im Allgemeinen als Marker für die Stoffwechselaktivität der Zelle und die vorhandene Menge korreliert mit der Zellteilungsrate (DeLong *et al.*, 1989; Poulsen *et al.*, 1993; Wallner *et al.*, 1993). Je aktiver die Zelle ist, desto mehr rRNS ist vorhanden und desto deutlicher ist das Signal nach der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Dieses ist jedoch nur ein Richtwert, da auch Organismen bei nur 10% der maximalen Wachstumsrate noch ein ausreichend deutliches Fluoreszenzsignal geben, in der Kultur jedoch nicht immer nachweisbar sind (Oda *et al.*, 2000). Zur optimalen Diagnostik mittels FISH empfiehlt sich jedoch eine wenn möglich sofortige Fixierung der Sputumproben, z.B. bei Probenentnahme, um die maximale Ribosomenzahl zu erhalten. Bei der Diagnostik von CF-Sputum wurde bereits beschrieben, dass das Ergebnis der mikroskopischen Einzelzellzählung nach FISH bis zu 10-fach über dem Ergebnis der quantitativen Kultur liegen kann (Hogardt *et al.*, 2000).

Der Einsatz neuer molekularbiologischer Nachweistechiken hat weiterhin zu überraschenden Erkenntnissen über die Mikrobiologie der Lungeninfektionen bei CF geführt. Neben den bekannten Pathogenen wie *P. aeruginosa*, BCC, *S. aureus* und *S. maltophilia* wurden viele weitere, v.a. anaerobe Spezies der Gattungen *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Rothia* und *Veillonella* nachgewiesen (van Belkum *et al.*, 2000; Kolak *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2004). Die biologische Aktivität dieser Organismen ist hoch (Rogers *et al.*, 2005) und eine abschließende Beurteilung über die Bedeutung dieser Spezies für die Lungenerkrankung bei CF steht noch aus.

4.2 Ein verbessertes Protokoll für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an

CF-Sputum

Durch das bisher bekannte, begrenzte Erregerspektrum im Sputum von CF-Patienten kann bei Einsatz der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit nur wenigen Sonden ein differenziertes Bild der Besiedelung der unteren Atemwege erstellt werden. Da diese Methode innerhalb kurzer Zeit Ergebnisse liefert, ist sie der Kultur an Schnelligkeit überlegen (Hogardt *et al.*, 2000). Die Auswertung und besonders die Quantifizierung von Erregermengen durch mikroskopische Auszählung ist jedoch sehr zeitaufwändig und wird durch die Viskosität und Verklumpung des Sputums erschwert. Die Keime sind nicht gleichmäßig über das Präparat verteilt, daher ist das Auszählen einer bestimmten Anzahl von Gesichtsfeldern nicht immer repräsentativ. Zudem zeigt CF-

Sputum eine starke Autofluoreszenz und enthält viele Entzündungszellen, freie DNS und Makromoleküle, die unspezifische Bindungsstellen für die Oligonukleotidsonden bieten. Durch diese unspezifische Fluoreszenz wird die Identifizierung einzelner markierter Bakterien enorm erschwert.

Autofluoreszenz ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei organischen Materialien und wird von verschiedenen Biomolekülen, wie Elastin (v.a. in der Lunge), Fibronectin und Lipofuszin, verursacht. Auch Blutzellen, v.a. Erythrocyten und eosinophile Granulozyten, besitzen eine intrinsische Fluoreszenz. (Monici *et al.* 1995, van de Lest *et al.* 1995). Eine durch Formaldehyd induzierte Fluoreszenz von Katecholaminen ist bekannt (Libet and Owman, 1974; Rowe *et al.*, 1993), spielt aber in Sputum vermutlich keine Rolle.

Bei der Hybridisierung von Sputum mit fluoreszenzmarkierten Sonden fallen vor allem zwei Strukturen auf, die nicht markierten Bakterien entsprechen, diesen jedoch morphologisch ähneln und damit die mikroskopische Auswertung erschweren. Zum einen sind dies granulaähnliche Anhäufungen, die einer bakteriellen Mikrokolonie ähneln, zum anderen einzelne stark fluoreszierende Partikel, die auch einem einzelnen markierten Bakterium entsprechen könnten. Durch Gegenfärbung mit dem DNS-Farbstoff DAPI konnte gezeigt werden, dass die erstgenannte Struktur dem Zytoplasma der in großen Mengen im CF-Sputum vorkommenden Entzündungszellen assoziiert ist und möglicherweise deren rauen endoplasmatischen Retikulum oder aber den zytoplasmatischen Granula entspricht. Die fluoreszierenden Partikel sind nicht zellassoziiert und finden sich frei und einzeln liegend im Sputum. Dieses lässt unspezifische Bindungen der Oligonukleotidsonden an freie DNS, Proteine oder die Oligomerisierung mehrerer Sondenmoleküle vermuten.

Ein Teilziel dieser Arbeit war es, das Hybridisierungsprotokoll für Sputum so zu verbessern, dass die unspezifische Fluoreszenz weitgehend reduziert und damit die mikroskopische Auswertung der Proben erleichtert wird.

Zur Reduktion der materialspezifischen Autofluoreszenz sind verschiedene Protokolle in der Literatur beschrieben worden. Diese sind zum einen messtechnischer Natur, wie z. B. die Verwendung einer schmaleren Filterbandbreite bei der Auswertung am Mikroskop (Sorensen *et al.*, 1997) oder die Nachbearbeitung von digitalen Aufnahmen der Präparate mit speziellen optischen Computerprogrammen (van de Lest *et al.*, 1995). Zum anderen gibt es die

Möglichkeit, die Ergebnisse durch Variationen der Hybridisierungsbedingungen zu verbessern.

Für unspezifische Bindungen der Sonde gibt es grundsätzlich zwei mögliche, sich aus dem Aufbau des Sondenmoleküls herleitende Bindungsstellen, nämlich Oligonukleotid und Farbstoff. So können Oligonukleotide durch eine Ähnlichkeit in der Basenfolge an heterologe Nukleinsäuren binden, es können Wasser- oder Schwefelbrücken zwischen Makromolekülen entstehen oder aber es entwickeln sich unspezifische Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen (Pinkel *et al.*, 1988; Wallner *et al.*, 1995; Fung *et al.*, 1998)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Anzahl von Veränderungen des Hybridisierungsprotokolls erprobt, um zum einen unspezifische Bindungen der Sonde (sowohl Oligonukleotid- als auch Farbstoffkomponente) zu unterbinden und zum anderen die Hintergrundfluoreszenz des Materials zu reduzieren.

Den deutlichsten Effekt hatte dabei der Zusatz von freiem Biotin. Fluoreszierende Partikel sind kaum zu sehen, irrtümlich markierte Granula sind nur noch sehr schwach sichtbar, während sich die fluoreszierenden Bakterien deutlich vom Hintergrund abheben (s. Abb. 3.13 auf S. 56).

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin der B-Gruppe und als prosthetische Gruppe von Carboxylasen an vielen metabolischen Reaktionen beteiligt. Es besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu einer großen Anzahl von Proteinen, mit denen es nicht-kovalente Bindungen eingeht, und wird über diese auch im Nukleus an Ribonukleinsäuren gebunden (Dakshinamurti and Chauhan, 1990; Bayer and Wilchek, 1990). Bei kurzer Vorinkubation mit den Proben kann es dadurch möglicherweise unspezifische Bindungsstellen der Sonde besetzen und verringert so die unspezifische Hintergrundfluoreszenz. Die Spezifität der Sonden wird durch den Zusatz von Biotin zur Hybridisierungslösung nicht beeinträchtigt (s.Tab. 3.2 auf S. 53). Die Verwendung von Biotin bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von CF-Sputum sollte daher grundsätzlich ins Protokoll integriert werden.

4.3 Durchflusszytometrie zur Analyse von CF-Sputum

Durch die Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz mit Biotin konnte im Rahmen dieser Arbeit die qualitative Auswertung der Sputumproben deutlich vereinfacht werden. Eine Quantifizierung von Erregermengen der verschiedenen Spezies bei Mischbesiedelung ist jedoch ebenso von Interesse wie die Reduktion der

Keimzahlen zur Verlaufskontrolle bei Antibiotikatherapie. In der quantitativen kulturellen Diagnostik wird die Angabe in koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Menge (g oder ml) gemacht. Auch bei FISH auf Objektträgern ist eine quantitative Auswertung durch das Auszählen einer festgelegten Anzahl von Blickfeldern pro Probe und nachfolgender Berechnung der Keimzahl pro ml Probenmaterial möglich (Hogardt *et al.*, 2000). Dieses Verfahren ist allerdings sehr zeitaufwändig, durch die ungleichmäßige Verteilung der Organismen im Probenmaterial nicht immer repräsentativ und stark von der individuellen Erfahrung und dem Müdigkeitsgrad mit nachlassender Konzentrationsfähigkeit des jeweiligen Untersuchers abhängig (Dixon *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2003). Von diesem Sachverhalt ausgehend wurde in dieser Arbeit versucht, das bewährte Verfahren der OT-FISH für die Probenauswertung am Durchflusszytometer anzupassen, um damit eine schnelle Erregeridentifizierung und eine untersucherunabhängige quantitative Auswertung zu ermöglichen.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die automatisierte Verarbeitung einer großen Anzahl von Proben in kurzer Zeit und untersucherunabhängig. Anfänglich wurde diese Technik vor allem in der Labormedizin zur Analyse von Blutzellen eingesetzt. Die Untersuchung von Mikroorganismen wie Bakterien oder Hefen war zuerst problematisch, da aufgrund des kleinen Zellvolumens die Diskriminierungskriterien reflektiertes Licht (‘forward’- und ‘sidewardscatter’) oder Fluoreszenz nicht zur Unterscheidung ausreichten. Durch Optimierung von Geräten und Protokollen ist die Durchflusszytometrie inzwischen eine etablierte Methode in der Mikrobiologie (Steen and Lindmo, 1979). Die Organismen werden über Größe, Granulationsgrad des Intrazellulärmaterials und Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die entweder direkt, über Antikörper oder Oligonukleotidsonden gebunden werden, unterschieden (Sahar *et al.*, 1983; Patchett *et al.*, 1991; Davey and Kell, 1996; Williams *et al.*, 1999; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Sincock and Robinson, 2001; Bunthof and Abee, 2002; Mueller *et al.*, 2006). In Kombination mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde die Technik insbesondere zur Analyse von bakteriellen Lebensräumen in der Umwelt wie Boden- (Diaper and Edwards 1994; Christensen *et al.* 1995; Thomas *et al.* 1997) oder Wasserproben (Monger and Landry 1993; Firth *et al.* 1994; Wallner *et al.* 1995 und 1997) eingesetzt. Die Kombination von Durchflusszytometrie und FISH zur Untersuchung von klinischen Materialien beschränkte sich bisher hauptsächlich auf die Analyse von Stuhlproben (van der Waaij *et al.* 1994; Zoetendal *et al.* 2002;

Mueller *et al.*, 2006). Sputum und bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wurden in der Vergangenheit zwar zytometrisch ausgewertet, allerdings ausschließlich zur Bestimmung der Lymphozytenzahl (Birring *et al.*, 2003; Leckie *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit Durchflusszytometrie kombiniert, um Mikroorganismen in Sputum nachzuweisen.

4.3.1 Anpassung des FISH-Protokolls zur Kombination mit Durchflusszytometrie

Die Herausforderung bei der Anpassung des OT-FISH Protokolls für die Verwendung am Durchflusszytometer bestand in der Verarbeitung des Probenmaterials in Suspension statt fixiert auf Objektträger. Durch die wiederholten Wasch- und die damit verbundenen Zentrifugationsschritte trat ein erheblicher Verlust an Probenmaterial auf. Dieser konnte jedoch bei sorgfältigem Arbeiten reproduzierbar bei etwa 60% gehalten werden. Die Messung absoluter Erregermengen gelang durch Einsatz von Flow-CountTM Fluorospheres nach entsprechender Eichung des Gerätes. Allerdings war dieses nur für gramnegative Bakterien möglich, eine erfolgreiche Hybridisierung grampositiver Organismen scheiterte am unvollständigen enzymatischen Verdau der Zellwand.

Im Vergleich zur quantitativen Kultur und der OT-FISH fallen die selbst nach Hochrechnung auf 100% geringen Werte der durchflusszytometrischen Messung auf, besonders bei niedrigen Erregermengen in der Probe. Die fehlende Vereinzelung der Bakterien vor der Messung ist die wahrscheinlichste Ursache dafür. Bereits auf den Objektträgern ließ sich beobachten, dass die Bakterien im Sputum zur Haufenbildung neigen. Werden diese in der Suspension nicht ausreichend vereinzelt, wird die gesamte Gruppe als ein einziges Ereignis registriert, ein Phänomen das bereits Wallner *et al.* (1995) bei der Auswertung von Belebtschlammproben beobachteten. Bei der Hochrechnung auf den ursprünglichen Wert multipliziert sich der Fehler, so dass das Endergebnis weit unter den entsprechenden Werten der Alternativmethoden liegt. Der Einsatz von wiederholten Waschschritten, Filtern und Detergenzien zur verbesserten Zellvereinzelung ist in der Literatur beschrieben (Diaper and Edwards, 1994; Christensen *et al.*, 1995; Wallner *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1997). In dem hier erprobten Protokoll der Suspensions-FISH mussten, wie bereits erwähnt, nach den benötigten Wasch- mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt werden, die zu einem unerwartet hohen Verlust an Bakterienzellen führten. Auf den Einsatz weiterer Waschschriffe zur besseren Zellvereinzelung wurde

daher verzichtet. Auch die Zentrifugation bei höherer Umdrehungszahl wurde erprobt, um die schwereren Bakterien von azellulärem Material besser zu trennen. Durch die größere Krafteinwirkung beim Zentrifugieren wurden jedoch mehr bakterielle Zelltrümmer und weniger intakte Bakterien beobachtet, so dass dieser Ansatz verworfen wurde.

Problematisch war weiterhin das korrekte ‚gating‘ der Bakterienpopulation im Durchflusszytometer, da diese in Bezug auf Größe und Granulationsgrad, gemessen als ‚forward‘- und ‚sidewardscatter‘, im Hintergrundrauschen der übrigen Sputumpartikel eingebettet und nicht als eigenständige Population zu erkennen war. Die Fluoreszenzintensität der markierten Bakterien war jedoch sehr deutlich und konnte zur Identifikation der Erreger und damit zur Auswertung der Proben verwendet werden. Jedoch war festzustellen, dass bei Messung der gleichen Menge an hybridisierten Bakterien in PBS-Suspension und in Sputum, die Anzahl der gemessenen Ereignisse in Sputum um etwa 20% geringer war. Eine mögliche Erklärung der verringerten Bakterienzahlen ist die Reduktion der Fluoreszenzintensität durch umgebende Makromoleküle wie etwa Mukopolysaccharide. Vergleichbare Ereignisse wurden bei der Auswertung von Belebtschlamm- und Bodenproben beobachtet (Wallner *et al.*, 1995).

Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Methodik wäre die Kombination von RNS- und DNS-Farbstoffen zur Intensivierung der Fluoreszenz und besseren Abgrenzung der Zielorganismen vom Hintergrundrauschen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar, da ein dafür benötigtes Durchflusszytometer mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge zur Verwendung von Farbstoffen mit verschiedenen Absorptions- und Emissionsmaxima (van der Waaij *et al.*, 1994, Wallner *et al.*, 1995) nicht zur Verfügung stand.

Diese Tatsache war auch der limitierende Faktor bei der Unterscheidung zweier Bakterienpopulationen im Durchflusszytometer. Es stand keine Oligonukleotidsonde zur Verfügung, deren Farbstoff von dem Laser des verwendeten Durchflusszytometers (488nm) angeregt wird und seine Fluoreszenz in einem anderen optischen Spektrum als Fluorescein emittiert, so dass zwei unterschiedliche Signale erkannt werden können. PC5, ein Fluoreszenzfarbstoff, der diese physikalischen Eigenschaften erfüllt, ist nicht an Oligonukleotide gebunden erhältlich, sondern bindet über einen Streptavidinanteil an das mit Biotin markierte

Oligonukleotid. Diese Konstruktion erwies sich als zu groß, um die bakterielle Membran zu durchdringen und konnte daher nicht verwendet werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass gramnegative Bakterien aus CF-Sputum mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden können, jedoch können weder verlässliche quantitative Aussagen getroffen werden, noch im Rahmen der vorhandenen Möglichkeiten verschiedene Populationen in einem Messvorgang unterschieden werden. Alternativ wäre zum einen die Konstruktion von PC5 markierten Oligonukleotidsonden sinnvoll. Zum anderen könnte die Verwendung eines Durchflusszytometers mit zwei Lasern, die auf verschiedenen Wellenlängen anregen und die Verwendung anderer Farbstoffe ermöglichen, das Problems umgehen. Es muss jedoch nach weiteren Wegen zur Verringerung des Materialverlustes und zur Hybridisierung von grampositiven Organismen gesucht werden.

4.4 Technische Neuerungen zur Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik bei CF

Es gibt aktuelle technische Weiterentwicklungen in der Molekularbiologie, die für eine Optimierung des FISH-Protokolls für CF-Sputum von Interesse sind.

Ende der 90er Jahre wurde die Verwendung von Mikrowellenöfen beschrieben, deren gepulster Einsatz eine Verkürzung der Hybridisierungszeit bis auf eine Stunde bewirkte. Bei der FISH von Chromosomen, also DNS, wurde dabei eine erhöhte Sensitivität der Sonden und geringere Hintergrundfluoreszenz festgestellt (Durm *et al.*, 1997; Kitayama *et al.*, 1999; Kitayama *et al.*, 2000; Wilkens *et al.* 2005; Weise *et al.*, 2005). Im Rahmen der mikrobiologischen Anwendungen gibt es inzwischen einen kommerziellen FISH-Kit zum Nachweis von *P. aeruginosa*, BCC, *H. Influenzae* und *S. maltophilia* (seaFAST® Cystic Fibrosis I 1 kit ;IZINTA, Hungary; formerly SeaPro Theranostics International, Netherlands), der durch Einsatz des Mikrowellenofens die Hybridisierungszeit auf 12min verkürzt. Allerdings wurden bei der Anwendung eine vermehrte Hintergrundfluoreszenz festgestellt, die besonders den Nachweis von BCC erschwerte (Brown and Govan, 2007).

Anfang der 90er Jahre wurden zum ersten Mal Peptidnukleinsäuren („*peptide nucleic acid*“, PNS) beschrieben, synthetisch hergestellte DNS-Imitationen. Dabei ist jedoch das negativ geladene Rückgrat der DNS aus Zucker und Phosphat durch eine

neutrale Polyamidkette aus N-(2-amyloethyl)glycin ersetzt (Egholm *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1994).

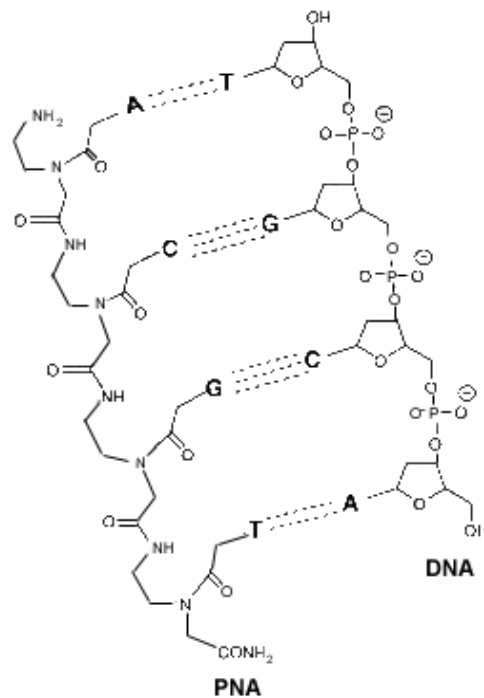


Abb 4.1: Peptidnukleinsäure an DNS gebunden (nach Jakubowski, 2005)

Über Nukleotidbasen kann dieses Molekül komplementär an Nukleinsäuren binden. Diese Bindungen verlaufen schneller und sind stabiler als die Bindungen von Oligonukleotidsonden mit DNS, zudem finden sie unabhängig von der Salzkonzentration des Hybridisierungspuffers statt. In mikrobiologischen Anwendungen wurde außerdem nachgewiesen, dass PNA-Sonden auch an schwer zugängliche Abschnitte der rRNS des Zielorganismus binden und die Zellwand von grampositiven und sogar säurefesten Bakterien unter normalen Hybridisierungsbedingungen durchdringen. Alle diese Eigenschaften erklären sich aus der fehlenden elektrischen Ladung des Moleküls, wodurch zum einen die elektrostatische Abstoßung zwischen Ribonukleinsäuremolekülen aufgehoben wird, und zum anderen die Sonde hydrophobe Eigenschaften erhält, die wiederum das Durchdringen von lipidhaltigen Zellwänden erleichtern (Egholm *et al.*, 1993, Stender *et al.*, 1999 und 2002). PNS-Sonden wurden erfolgreich an klinischen Materialien wie Blutkulturen (Oliveira *et al.*, 2002) oder Sputumabstrichen zum Nachweis von *Mycobakterium tuberculosis* (Stender *et al.*, 1999) eingesetzt. Weitere Sonden für den Nachweis von *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* und *Salmonella* spp. sind in der

Literatur beschrieben (Perry-O'Keefe *et al.*, 2001). Durch die veränderten Bindungseigenschaften können grampositive und gramnegative Organismen in dem selben Hybridisierungsvorgang nachgewiesen werden, es wird eine höhere Spezifität und ein helleres Fluoreszenzsignal erreicht, was die Auswertung vereinfacht (Stender *et al.*, 2002). All dies macht die PNS-Sonden zu interessanten Kandidaten zum Einsatz mit CF-Sputum. Die einfache Hybridisierung grampositiver Keime erleichtert ganz besonders die Auswertung in der Durchflusszytometrie. In diesem Zusammenhang ist auch der Einsatz von PNS-*molecular beacons* erwähnenswert, da durch diese auf den Einsatz von Waschschritten zur Entfernung der nicht bindenden Sonden verzichtet werden kann. Dieses würde die Reduktion der Bakterienzahlen durch wiederholte Zentrifugation verhindern (Stender *et al.*, 2002; Xi *et al.*, 2003).

Geeigneter für die quantitative Auswertung eines Materials wie Sputum, das zu Klumpen- und Flockenbildung neigt, wäre jedoch die digitale Bildanalyse (*digital image analysis*). Bei dieser Methode werden die hybridisierten Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop bei relativ geringer Vergrößerung (400fach) analysiert. Das Biovolumen der markierten Zellen wird als Anteil am Gesamtzellbiovolumen gemessen. Versetzt man das Probenmaterial mit verschiedenen bekannten Mengen von *E. coli*, die als interner Maßstab dienen, lassen sich absolute Zellzahlen messen. Kombiniert mit einem motorisierten computergesteuerten Mikroskopiertisch, der zufällig ausgewählte Blickfelder auf dem Objektträger auswertet, kann die Methode voll automatisiert werden. (Daims *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2003).

All diese Weiterentwicklungen zeigen neue attraktive Möglichkeiten auf, die die mikrobiologische Diagnostik von CF-Sputum schneller und spezifischer machen können.

5 Zusammenfassung

Die Mukoviszidose (engl: *cystic fibrosis*, CF) ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung. Der Defekt des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, einem membranständigen Chloridionenkanal, manifestiert sich an diversen Organsystemen, wobei Infektionen des Respirationstraktes im Vordergrund stehen. CF-Patienten produzieren ein viskoses Tracheobronchialsekret, welches die mukoziliäre Clearance behindert. In der Folge etablieren sich chronisch verlaufende Lungeninfektionen mit einem CF-typischen Erregerspektrum (v.a. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*-Komplex, *Haemophilus influenzae* und *Stenotrophomonas maltophilia*), die letztendlich lebenslimitierend sind. Durch die frühzeitige und regelmäßige Gabe von Antibiotika wird versucht, die inflammatorische und erregerassoziierte Schädigung des Lungengewebes zu kontrollieren. Dabei ist eine mikrobiologische Diagnostik, die die Erreger schnell und mit hoher Sensitivität und Spezifität identifiziert, von großer Bedeutung.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit markierten Oligonukleotidsonden zum Nachweis ribosomaler RNS ist eine spezifische und sensitive Methode zum Erregernachweis. Sie benötigt im Vergleich zum mindestens 48h in Anspruch nehmenden kulturellen Nachweis nur wenige Stunden und erfasst auch bereits nicht mehr kultivierbare Erreger, z.B. nach erfolgter Antibiotikatherapie. Das relativ begrenzte Erregerspektrum der Lungeninfektionen bei CF bietet gute Voraussetzungen für den Einsatz der FISH-Diagnostik. Als problematisch hat sich hierbei das viskose und inhomogene CF-Sputum erwiesen, das aufgrund seiner Zusammensetzung bei der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden eine ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz zeigt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einsatz der FISH-Technik zum Nachweis CF relevanter Erreger weiter zu optimieren. Zum einen sollte der Einfluss, den die Probenlagerung bis zur Weiterverarbeitung auf den Erregernachweis hat, untersucht werden. Dabei erwies sich 4°C als geeignete Lagerungstemperatur, da die Mikroorganismen trotz Verringerung der Ribosomenzahl und damit etwas abgeschwächtem Fluoreszenzsignal bis zu 72h nach Probenentnahme mit FISH unverändert sensitiv nachweisbar sind, ohne dass eine Überwucherung langsamer wachsender Keime eintritt. Zum anderen sollte eine Minimierung der Hintergrundfluoreszenz erreicht werden. Verschiedene Modifikationen des Hybridisierungsprotokolls wurden

miteinander verglichen. Durch die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Oligonukleotidsonden mittels einer 30minütigen Vorinkubation mit freiem Biotin wurde die Hintergrundfluoreszenz erfolgreich vermindert, wobei die markierten Bakterien unverändert gut nachweisbar waren. Um die quantitative Auswertung der Sputumproben zu vereinfachen, wurde weiter ein Protokoll zur Analyse der FISH-Proben im Durchflusszytometer entwickelt. Durch diese schnelle, automatisierte Technik entfällt die zeitraubende manuelle Auswertung der Proben.

Eine Integration dieser neu entwickelten Ergänzungen in bestehende Protokolle vereinfacht und beschleunigt die mikrobielle Diagnostik CF-typischer Erreger und eröffnet die Möglichkeit eines größeren Probendurchsatzes ohne zusätzliche Kosten.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ca.	circa
CF	Cystische Fibrose, Mukoviszidose
Cl	Chlorid
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DTT	Dithiothreitol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
FEV ₁	Einsekundenausatemkapazität (forced expiratory volume)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FLUOS	Fluorescein
g	Gramm/Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	hora = Stunde
HF	Hintergrundfluoreszenz
H ₂ O	Wasser
i.d.R.	in der Regel
l	Liter
KBE	koloniebildende Einheiten
LB	Luria-Bertani-Medium
m	Meter/Milli = 10 ⁻³
M	Mol
Max.	Maximum
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
μ	Mikro = 10 ⁻⁶
n	Nano = 10 ⁻⁹
Na	Natrium
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
p	Pico = 10 ⁻¹²
PBS	phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peptidnukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale RNS
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
SDS	sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannter
spp.	Subspezies
SSC	Standard-Saline-Citrate
s.u.	siehe unten
TAMRA	Tetramethylrhodamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trypton-Soya-Agar
TSB	Trypton-Soya-Broth
u.	und
u.a.	und andere/unter anderem
Ü/N	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.2 Literaturverzeichnis

- Aebi, C., A. Bauernfeind, G. Döring, B. Przyklenk, I. Schneider und M.H. Schöni: Mikrobiologie in D. Reinhardt, M. Götz, R. Kraemer, und M.H. Schöni: Cystische Fibrose. Springer Verlag Berlin, 3. Auflage 2001
- Álvarez-Barrientos, A., J. Arroyo, R. Canton, C. Nombela and M. Sanchez-Perez 2000: Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 13 (2): 167-195
- Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl 1990: Fluorecent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. Journal of Bacteriology 172: 762-770
- Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olsen, S.W. Chrisholm, R. Devereux and D.A.Stahl 1990a: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed populations. Appl Environ Microbiol 56: 1919-1925
- Amann, R.I., W. Ludwig and K.-H. Schleifer 1995: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 59: 143-169
- Amann, R.I., J.Snaidr, M.Wagner , W. Ludwig and K.-H Schleifer. 1996: In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. J Bacteriol 178: 3496-3500
- Andersen, D.H. 1938: Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. Am J Dis Child 56:334-340.
- Andersen, D. H. and R. G. Hodges. 1946. Celiac syndrome: genetics of cystic fibrosis of pancreas with consideration of etiology. Am. J. Dis. Child. 72:62-80
- Anson, D.S., G.J. Smith and D.W. Parsons 2006: Gene therapy for cystic fibrosis airway disease – is clinical success imminent? Curr Gene Ther 6(2): 161-179
- Apajalahti, J.H., A. Kettunen, P.H. Nurminen, H. Jatila and W.E. Holben 2003: Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. Appl Environ Microbiol 69(9): 5731-5735
- Armstrong, D.S., K. Grimwood, J.B. Carlin, R. Carzoni, A. Olinski and P.D. Phelan 1996: Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 21: 267-275
- Artz, L.A., V.A.J. Kempf and I.B. Autenrieth 2003: Rapid screening for *Streptococcus agalactiae* in vaginal specimens of pregnant women by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 41: 2170–2173
- Baird, R.M., H. Brown, A.W. Smith and M.L. Watson 1999: *Burkholderia cepacia* ist resistant to the antimicrobial activity of airway epithelial cells. Immunopharmacology 44: 267-272

Baker, N., G.C. Hansson, H. Leffler, G. Riise and C. Svanborg-Eden 1991: *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme-S is an adhesin. Infect Immun 59: 2859-2863

Ballard, R.W., N.J. Palleroni, R.Y. Stanier and M. Mandel 1970: Taxonomy of the aerobic pseudomonads *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliiicola* and *P. caryophylli*. J Gen Microbiol 60: 199-214

Bals, R., X. Wang, M. Zasloff and J.M. Wilson 1998: The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9541-6

Bals, R., D.J. Weiner, R.L. Meegalla and J.M. Wilson 1999: Transfer of a cathelicidin antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. J Clin Invest 103: 1113-1117

Barer, M.R., L.T. Gribbon, C.R. Harwood and C.E. Nwoguh 1993: The viable but not culturable hypothesis and medical microbiology. Rev Med Microbiol 4: 183-191

Baskin, D.G., B.J. Norwood, M.W. Schwartz and D.J. Koerker 1995: Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. Endocrinology 136 (12): 5547-54

Baskin, D.G., M. W. Schwartz, R. J. Seeley, S.C. Woods, D. Porte, Jr., J.F. Breininger, Z. Jonak, J. Schaefer, M. Krouse, C. Burghardt, L. A. Campfield, P. Burn and J.P. Kochan 1999: Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. J Histochem Cytochem. 47(3):353-62.

Bauernfeind, A., G. Emmeringer, G. Hörl, S. Ott, B. Przyklenk and C. Weisslein-Pfister 1987: Bacteriological effects of anti-*Pseudomonas aeruginosa* chemotherapy in cystic fibrosis. Infection 15(5): 403-406

Bayer, E.A. and M. Wilchek 1990: Biotin-binding proteins: overview and prospects. Methods Enzymol. 184:49-51.

van Belkum, A., N.H.M. Renders, S. Smith, S.E. Overbeek and H.A. Verbrugh 2000: Comparison of conventional and molecular methods for the detection of bacterial pathogens in sputum samples from cystic fibrosis patients. FEMS Immunology and Medical Microbiology 27: 51-57

Birrer, P., N.G. McElvaney, A. Rudeberg, C.W. Sommer, S. Liechti-Gallanti, R. Kraemer, R. Hubbard and R.G. Crystal 1994: Protease antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 150: 448-454

Birring, S.S., C.E. Brightling, F.A. Symon, S.G. Barlow, A.J. Wardlaw, I.D. Pavord 2003: Idiopathic chronic cough: association with organ specific autoimmune disease and bronchoalveolar lymphocytosis. Thorax 58: 1066–1070

Bolton, E.T. and B.J. McCarthy 1962: A general method for isolation of RNA complementary to DNA. Proc Nat Acad Sci Wash 48: 1390-1997

Bonfield, T.L., J.R. Panuska, M.W. Konstan, K.A. Hilliard, J.B. Hilliard, H. Ghnaim and M. Berger 1995: Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111-2118

Böttger, E.C. 1995: Ribosomale Nukleinsäuren – eine universelle diagnostische Zielstruktur. *Biospektrum* 3: 15-22

Boucher, R.C. 1998: ASL in normal and CF subjects is isotonic: evidence for the isotonic volume absorption/mucus clearance hypothesis for the pathogenesis of early CF lung disease. *Pediatr Pulmonol Suppl* 17: 132

Boucher, R.C., A. Plagens and U. Wagner 2003: Zystische Fibrose. In: M. Dietel, J. Dudenhausen und N. Suttorp: *Harrisons Innere Medizin*, 15. Auflage, Deutsche Ausgabe; ABW Wissenschaftsverlag Berlin; Kapitel 257, S. 1633-1636

Brown, A.R. and J.R.W. Govan 2007: Assessment of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and PCR-based methods for the rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex organisms direct from sputum. *J Clin Microbiol* published online ahead of print 25 April 2007

Bryan, R., D. Kube, A. Perez, P. Davis and A. Prince 1998: Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of AsialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* bonding by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(2): 269-277

Bunthof, C.J. and T. Abee 2002: Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl Environ Microbiol* 68(6): 2934–2942

Burkholder, W.H. 1950: Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40: 115-117

Burnie, J.P., E.J. al-Wardi, P. Williamson, R.C. Matthews, K. Webb and T. David 1995: Defining potential targets for immunotherapy in *Burkholderia cepacia* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10:157-164

Burns, J.L., J. Emerson, J.R. Stapp, D.L. Yim, J. Krzewinski, L. Loudon, B.W. Ramsey and C.R. Clausen 1998: Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis* 27: 158-163

Busch, R. 1978: Die Geschichte der Mukoviszidose. *Das deutsche Gesundheitswesen*; 33: 316

Bush, A. and C. Wallis 2000: Time to think again: cystic fibrosis is not an „all or nothing“ disease. *Pediatr Pulmonol* 30: 139-144

Carr, S.D. and R. Dinwiddie 1996: Annual review or continuous assesment. *J R Soc Med* 89 Suppl. 27: 3-7

Christensen, H., R.A. Olson and L.R. Bakken 1995: Flow cytometric measurements of cell volumes and DNA contents during culture of indigenous soil bacteria. *Microb Ecol* 29: 49-62

Coenye, T., P. Vandamme, J.R.W. Govan and J.J. LiPuma 2001: Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 39(10): 3427-3436

Coleman, F.T., S. Mueschenborn, G. Meluleni, C. Ray, V.J. Carey, S.O. Vargas, C.L. Cannon, F.M. Ausubel and G.B. Pier 2003: Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci* 100(4): 1949-1954

Conese, M. and B.M. Assael 2001: Bacterial infections and inflammation in the lungs of cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis* 20: 207-213

Costerton, J.W. 2001: Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infections. *Trends Microbiol* 9: 50-52

Coulter® 1998: Reference-Handbuch für das Coulter Epix XL-MCL Durchflussszytometer

Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2005 Annual Report, Bethesda, Maryland. Electronic publication on www.cff.org

Daims, H., N.B. Ramsing, K.-H. Schleifer and M. Wagner 2001: Cultivation-independent, semiautomatic determination of absolute bacterial cell numbers in environmental samples by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 67: 5810-5818.

Dakshinamurti, Krishnamurti and Jasbir Chauhan 1990: Nonavidin biotin-binding proteins. *Methods Enzymol* 184: 93-102

Davey, H.M. and D.B. Kell 1996: Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analysis; *Microbiological Reviews* 60: 641-696

Davies, D.G. and G.G. Geesey 1995: Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 61: 860-867

Davis, B.D., S.M. Luger and P.C. Tai 1986: Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 166 (2): 439-445

DeLong, E.F., G.S. Wickham and N.R. Pace 1989: Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 243: 1360-1363

Demko, C.A., R.C. Stern and C.F. Doershuk 1998: *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatr Pulmonol* 25: 304-308

Denhardt, D.T. 1966: A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 23: 641-646

Denton, M., N.J.Todd, K.G.Kerr, P.M. Hawkey and J.M. Littlewood 1998: Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol* 36 (7): 1953-1958

Denton, M. 2001: *Stenotrophomonas maltophilia* - questions and answers. Leeds University Teaching Hospitals, Leeds, UK. Online on www.cysticfibrosismedicine.com

Diaper, J.P. and C. Edwards 1994: Flow cytometric detection of viable bacteria in compost. *FEMS Microbiol Ecol* 14: 213-220

Dinwiddie, R. 2000: Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 3-8

diSant'Agnese, P.A., R.C. Darling, G.A. Gerera and E. Shea 1953: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12: 549-536

Dixon, B.R., M. Parenteau, C. Martineau and J. Fournier 1997: A comparison of conventional microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry in the detection of *Giardia lamblia* cysts in beaver fecal samples. *J Immunol Meth* 202: 27-33

Durm, M., F.M. Haar, M. Hausmann, H. Ludwig and C. Cremer 1997: Optimized Fast-FISH with alpha-satellite probes: acceleration by microwave activation. *Braz J Med Biol Res* 30(1): 15-23

Dymock, D., A.J. Weightman, C. Scully and W.G. Wade 1996: Molecular analysis of microflora associated with dento-alveolar abscesses. *J Clin Microbiol* 34: 537-542

Egholm, M., O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S.M. Freier, D.A. Driver, R.H. Berg, S.K. Kim, B. Norden and P.E. Nielsen 1993: PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nature* 365: 556-568

Engelhardt, J. und W. Knebel 1993: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Physik in unserer Zeit* 2: 70-77

Engelhardt, J.F., J.R. Yankaskas, S.A. Ernst, Y. Yang, C.R. Marino, R.C. Boucher, J.A. Cohn and J.M. Wilson 1992: Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in human bronchus. *Nat Genet* 2(3): 240-248

Fanconi, G., E. Uehlinger und C. Knauer 1936: Das Zoliakiesyndrom bei angeborener Pankreasfibromatose und Bronchiektasen. *Wiener Med Wochenschr* 86: 753

- Fazii, P., E. Ciancaglini and G. Riario Sforza 2002: Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21(5): 373-378
- Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, D. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang and A. Prince 1998: Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in pulmonary infection. *Infect Immun* 66(1): 43-51
- Felske, A., Akkermans, A.D.L. and De Vos, W.M. 1998: *In situ* detection of an uncultured predominant *Bacillus* in Dutch grassland soil. *Appl Environ Microbiol* 64: 4588-4590
- Firth, J.R., J.P. Diaper and C. Edwards 1994: Survival and viability of *Vibrio vulnificus* in sea water monitored by flow cytometry. *Lett Appl Microbiol* 18: 268-271
- Fitzsimmons, S.C. 1993: The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* 123: 1-9
- Frangolias, D.D., E. Mahenthiralingam, S. Rae, J.M. Raboud, A.G. Davidson, R. Wittmann and P.G. Wilcox 1999: *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis. Variable disease course. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1572-1577
- Frischer, M.E., P.J. Floriani and S.A. Nierzwicki-Bauer 1996: Differential sensitivity of 16S RNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence in situ hybridization is a result of ribosomal higher order structure. *Can. J. Microbiol.* 42: 1061-1071
- Fung, J., M. Moronne and H.-U. Weier 1998: Simple blocking system for use with maleimide-labeled nucleic acid probes; *Biotechniques* 25: 390-4
- Gaillard, J.L., P. Cahen, C. Delacourt, C. Silly, M. Le Bourgeois, C. Coustère, J. de Blic, G. Lenoir and P. Scheinmann 1995: Correlation between activity of beta-lactam agents in vitro and bacteriological outcome in acute pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 14(4): 292-296
- Gall, J.G. and M.L. Pardue 1969: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci* 63: 378-383
- Gallati, S. 2003: Genetics of cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 24(6): 629-638
- Ganz, T. and I.R. Lehrer 1995: Defensins. *Pharmacol Ther* 66: 191-205
- Gibson R.L., J.L. Burns and B.W. Ramsey 2003: Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-951
- Giovannoni, S.J., T.B. Britschgi, C.L. Moyer and K.G. Field 1988: Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63
- Glockner, F.O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler and R. Amann 2000: Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton

- reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66(11): 5053-5065
- Goldstein, W. and G. Doring 1986: Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Respir Dis* 134: 49-56
- Goss, C.H., K.Otto, M.L.Aitken and G.D. Rubenfeld 2002: Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 166(3):356-61
- Goss, C.H., N. Mayer-Hamblett, M.L. Aitken, G.D. Rubenfeld and B.W. Ramsey 2004: Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax* 59: 955-959
- Govan, J.R.W. and V. Deretic 1996: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60: 539-574
- Govan, J.R.W., J.E. Hughes and P. Vandamme 1996: *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 45: 395-407
- Graff, G.R. and J.L. Burns 2002: Factors affecting the incidence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation in cystic fibrosis. *Chest* 121: 1754-1760
- Greenberger, P.A. 1997: Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *JAMA* 278: 1924-1930
- Griese, M., E.M. App, A. Derouix, A. Burkert and A. Schams 1997: Recombinant human Dnase (rhDNase) influences phospholipid composition, surface activity rheology and consecutively clearance indices of cystic fibrosis sputum. *Pulm Pharmac Ther* 10: 21-27
- Griesenbach, U., D.M. Geddes and E.W. Alton 2006: Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* 13(14): 1061-1067
- Groman, J.D., M.E. Meyer, R.W. Wilmott, P.L. Zeitlin and G.R. Cutting 2002: Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 347(6): 401-407
- Groman, J.D., B. Karczeski, M. Sheridan, T.E. Robinson, M.D. Fallin and G.R. Cutting 2005: Phenotypic and genetic characterization of patients with features of "nonclassic" forms of cystic fibrosis. *J Pediatr* 146(5): 675-680
- Grotheus, D., U. Koopmann, H. von der Hardt and B. Tummler 1988: Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains. *J Clin Microbiol* 26: 1973-1977
- Gupta, S.K., R.S. Berk, S. Masinick and L.D. Hazlett 1994: Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect immun* 62: 4572-4579

- Hahn, D., R.I. Amann, W. Ludwig, A.D.L. Ackermans and K.-H. Schleifer 1992: Detection of micro-organisms in soil after in-situ-hybridization with rRNA targeted fluorescently labeled oligonucleotides. *J Gen Microbiol* 138: 879-887
- Hart, C.A. and C. Winstanley 2002: Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children. *British Medical Bulletin* 61: 81-96
- Hartmann, H., H. Stender, A. Schäfer, I.B. Autenrieth and V.A.J. Kempf 2005: Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination of fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry. *J Clin Microbiol* 43: 4855–4857
- Hayashi, H., R. Takahashi, T. Nishi, M. Sakamoto and Y. Benno 2005: Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 54(11): 1093-1101
- Heiles, H.B., E. Genersch, C. Kessler, R. Neumann and H.J. Eggers 1988: In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. *Biotechniques* 6: 978-981
- Henke, M.O., A. Renner, R.M. Huber, M.C. Seeds and B.K. Rubin 2004: MUC5AC and MUC5B mucins are decreased in cystic fibrosis airway secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 86-91
- Hill, D., B. Rose, A. Pajkos, M. Robinson, P. Bye, S. Bell, M. Elkins, B. Thompson, C. MacLeod, S.D. Aaron and C. Harbour 2005: Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 43(10): 5085-5090
- Hogardt, M., K. Trebesius, A.M. Geiger, M. Hornef, J. Rosenegger and Heesemann, J. 2000: Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J. of Clinical Microbiology* 38: 818-825
- Hogardt, M., S. Häußler, B. Balke, B.C. Kahl, S. Schmoldt, L. Leitritz, G. Jäger, M. Kappler, S. Suerbaum and J. Heesemann 2006a: Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose. In *Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ)* 24, Hrg. H. Mauch, A. Podbielski, M. Herrmann und E. Kniehl; Elsevier/Urban und Fischer, München/Jena
- Hogardt, M., S. Schubert, K. Adler, M. Gotzfried and J. Heesemann 2006b: Sequence variability and functional analysis of MutS hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int J Med Microbiol* 296(4-5): 313-320
- Hogardt, M., C. Hoboth, S. Schmoldt, C. Henke, L. Bader and J. Heesemann 2006c: Stage specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection of cystic fibrosis patients. *In press*

Hoiby, N. 1977: *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. Acta Path Microbiol Scan Sect. C Suppl. 262: 3-96

Hollinshead, M., J. Sanderson and D.J. Vaux 1997: Anti-biotin antibodies offer superior organelle-specific labeling of mitochondria over avidin or streptavidin. J Histochem Cytochem. 45(8):1053-7

Houtmeyers, E., R. Gosselink, G. Gayan-Ramirez and M. Decramer 1999: Regulation of mucociliary clearance in health and disease. Eur Respir J 13: 1177-1188

Hu, J., A. P. Limaye, M. Horn, S. Juretschko, R. Gautam, and T. R. Fritsche. 2002. Direct detection of *legionellae* in respiratory tract specimens by using fluorescence *in situ* hybridization, p. 221–224. In R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, and P. C. Lück (ed.), *Legionella*. ASM Press, Washington, D.C.

Imundo, L., J. Barasch, A. Prince and Q. Al-Awqati 1995: Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. Proc Natl Acad Sci USA 92: 3019-3023

Jakubowski, H 2005: DNA binding drugs. In Biochemistry Online: An approach based on chemical logic, chapter 5E: New methods in drug development. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bcintro/default.html>

Johansen, H.K. and N. Hoiby 1992: Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. Thorax 47: 109-111

John, H.A., M.L. Birnstiel and K.W. Jones 1969: RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223: 582-587

Jones, A.M., M.E. Dodd, J.R.W. Govan, V. Barcus, C.J. Doherty, J. Morris and A.K. Webb 2004: *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. Thorax 59: 948-951

Kalpaxis, D.L., P. Karahlios and M. Papapetropoulos 1998: Changes in ribosomal activity of *Escherichia coli* cells during prolonged culture in sea salts medium. J. Bacteriol 180 (12): 3114–3119

Kapur, S., M. Abmed, V. Singh, G. Krupp, S. Salhan and A. Mittal 2006: Reliability of detecting rRNA sequences of *Chlamydia trachomatis* with fluorescence *in situ* hybridization without amplification. Acta Cytol 50(3): 277-283

Karpati, F., A.S. Malmborg, H. Alfredsson, L. Hjelte and B. Strandvik 1994: Bacterial colonisation with *Xanthomonas maltophilia*--a retrospective study in a cystic fibrosis patient population. Infection 22(4):258-63

Kaul, M., C.M. Barbieri and D.S. Pilch 2005: Defining the basis for the specificity of aminoglycoside rRNA recognition: a comparative study of drug binding to the A sites of *Escherichia coli* and human rRNA. J Mol Biol 346: 119-134

Kayser, F.H., K.A. Bienz, J. Eckert und R.M. Zinkernagel: Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Auflage 1998

Kempf, V.A., Trebesius, K. and Authenried, I.B. 2000: Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 38: 830-838

Kempf, V.A., T. Mandle, U. Schumacher, A. Schafer and I.B. Autenrieth 2005: Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. Int J Med Microbiol 295(1):47-55

Kennedy, K.E., S.A. Daskalakis, L. Davies and P. Zwadyk 1989: Non-isotopic hybridization assay for bacterial DNA samples. Mol Cell Probes 3: 167-177

Kerem, B.S., J.M. Rommens, J.A. Bucharad, D. Markiewicz, T.K. Cox, A. Chakravarty, M. Buchwald and L.C. Tsui 1989: Analysis of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080

Kerem, E., M. Corey, R. Gold and H. Levison 1990: Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonisation with *Pseudomonas aeruginosa*. J Pediatr 116: 714-719

Kerr, K.G., J. Anson and P.M. Hawkey 1994: Adherence of clinical and environmental strains of *Xanthomonas maltophilia* to plastic material. Abstr. B-339, p. 89 in Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, Nev. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Kitayama, Y., H. Igarashi and H. Sugimura 1999: Amplification of FISH signals using intermittent microwave irradiation for analysis of chromosomal instability in gastric cancer. Mol Pathol 52(6): 357-359

Kitayama, Y., H. Igarashi and H. Sugimura 2000: Different vulnerability among chromosomes to numerical instability in gastric carcinogenesis: stage-dependent analysis by FISH with the use of microwave irradiation. Clin Cancer Res 6(8): 3139-3146

Knowles, M.R. and R.C. Boucher 2002: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J Clin Invest 109:571-577

Knowlton, R.G., O. Cohen-Haguénaur, N.V. Cons, J. Frezal, V.A. Brown, D. Barker, J.C. Braman, J.W. Schumm, L.C. Tsui, M. Buchwald, H. Donis-Keller 1985: A polymorphic DNA-marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. Nature 318: 380-382

Koch, C. and N. Hoiby 1993: Pathogenesis of cystic fibrosis. Lancet 341: 1065-1069

- Koch, C. and N. Hoiby 2000: Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* 67: 239-247
- Koepke, J.A. and A.L. Landay 1989: Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. *Clin Immunol Immunopathol* 52: 19-27
- Kolak, M., F. Karpati, H.J. Monstein and J. Jonasson 2003: Molecular typing of the bacterial flora in sputum of cystic fibrosis patients. *Int J Med Microbiol* 293: 309-317
- Kramer, J.G. and F.L. Singleton 1992: Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl Environ Microbiol* 58: 201-207
- Laing, F.P.Y., K. Ramotar, R.R. Read, N. Alfieri, A. Kureishi, E.A. Henderson and T.J. Louie 1995: Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. *J Clin Microbiol* 33: 513-518
- Langer, P.R., A.A. Waldrop and D.C. Ward 1981: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6633-6637
- Leckie, M.J., G.R. Jenkins, J. Khan, S.J. Smith, C. Walker, P.J. Barnes and T.T. Hansel 2003: Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+). *Thorax* 58: 23-29
- Ledson M.J., M.J. Gallagher, J.E. Corkill, C.A. Hart and M.J. Walshaw 1998: Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*. *Thorax* 53(5):432-436
- van de Lest, C.H.A., E.M.M. Versteeg, J.H. Veerkamp and T.H. van Kuppevelt 1995: Elimination of autofluorescence in immunofluorescence microscopy with digital imaging processing. *J Histochem Cytochem* 43(7):727-30
- Libet, B. and C. Owman 1974: Concomitant changes in formaldehyde-induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory postsynaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion, induced by stimulation of the preganglionic nerve or by a muscarinic agent. *J Physiol* 237: 635-662
- de Lillo, A., V. Booth, L. Kyriacou, A.J. Weightman and W.G. Wade 2004: Culture-independent identification of periodontitis-associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol* 42(12): 5523-5527
- LiPuma, J.J., S.E. Dasen, D.W. Nielson, R.C. Stern and T.L. Stull 1990: Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 342: 1094-1096
- LiPuma, J.J., T. Spilker, L.H. Gill, P.W. Campbell 3rd, L. Liu and E. Mahenthiralingam 2001: Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 92-96

- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R. and Amann, R. 1998: Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 64: 2691-2696.
- Lu, S., M. Park, H.S. Ro, D.S. Lee, W. Park and C.O. Jeon 2006: Analysis of microbial communities using culture-dependent and culture-independent approaches in an anaerobic/aerobic SBR reactor. *J Microbiol* 22(2): 155-161
- Ludwig, W. and K.H. Schleifer 1994: Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* 15: 155-173
- Lyczac, J.B., C.L. Cannon and G.B. Pier 2002: Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15: 194-222
- Mahenthalingam, E., T. Coenye, J.W. Chung, D.P. Speert, J.R. Govan, P. Taylor and P. Vandamme 2000: Diagnostically and experimentally useful panel of strains from *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 38: 910-913
- Mahenthalingam E, P. Vandamme, M.E. Campbell, D.A. Henry, A.M. Gravelle, L.T. Wong, A.G. Davidson, P.G. Wilcox, B. Nakielna and D.P. Speert 2001: Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis* 33: 1469-1475
- Malone, J.L., T.E. Simms, G.C. Gray, K.F. Wagner, J.R. Burge and D.S. Burke 1990: Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus Type 1-infected patients: Total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. *J AIDS* 3: 144-151
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner and K.-H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 593-600
- Manz, W., U. Szewzyk, P. Ericsson, R. Amann, K.-H. Schleifer and T.-A. Stenstrom 1993: *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 59: 2293-2298
- Martin, D.W. and C.D. Mohr 2000: Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. *Infect Immun* 68: 24-29
- Mathee, K., O. Ciofu, C. Sternberg, P.W. Lindum, J.I.A. Campbell, P. Jemsen, A.H. Johnson, M. Givskov, D.E. Ohman, S. Molin, N. Høiby and A. Kharazmi 1999: Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiol* 145: 1349-1457
- Matsuhisa, A., Y. Saito, H. Ueyama, Y. Aikawa and T. Ohono 1994: Detection of staphylococci in mouse phagocytic cells by ISH using biotinylated DNA probes; *Biotechnic & Histochemistry* 69: 31-37

- McPherson, M.A. and R.C. Dormer 1992: Abnormalities in intracellular regulation in cystic fibrosis. *Brit Med Bul* 48: 748-776
- Medici, T.C., M. Häcki und M.V. Spiegel 2001: Husten und Auswurf: Diagnostik in der Praxis. *Schweiz Med Forum* 28: 727-730
- Millar, M.R., C.J. Linton, A. Cade, D. Glancy, M. Hall and H. Jalal 1996: Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of pre-term infants with and without necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol* 34: 2506-2510
- Monici, M., R. Pratesi, P.A. Bernabei, R. Caporale, P.R. Ferrini, A.C. Croce, P.A. Balzarini and G. Bottiroli 1995: Natural fluorescence of white blood cells: spectroscopic and imaging study. *J Photochem Photobiol B* 30, 29-37
- Monger, B.C. and M.R. Landry 1993: Flow cytometric analysis of marine bacteria with Hoechst 33342. *Appl Environ Microbiol* 59: 905-911
- Mueller, S., K. Saunier, C. Hanisch, E. Norin, L. Alm, T. Midtvedt, A. Cresci, S. Silvi, C. Orpianesi, M.C. Verdenelli, T. Clavel, C. Koebnick, H.-J. F. Zunft, J. Doré and M. Blaut 2006: Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72 (2): 1027–1033
- Murray, R.G.A., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P. De Vos, M. Goodfellow, P.A.D. Grimont, N. Pfenning, E. Stachebrandt and G.A. Zavarin 1990: Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 40: 213-215
- Nair, B. M., K.-J. Cheung Jr., A. Griffith and J. L. Burns 2004: Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III (*B. cenocepacia*) *J. Clin. Invest.* 113:464–473
- Nielsen, P.E., M. Egholm and O. Buchard 1994: Peptide nucleic acid (PNA), a DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate Chem* 5: 3-7
- Nygaard, A.P. and B.D. Hall 1963: A method for the detection of RNA-DNA complexes. *J Mol Biol* 9: 125-142
- Oda, Y., S.-J. Slagman, W.G. Meijer, L.J. Forney and J.C. Gottschal 2000: Influence of growth rate and starvation on fluorescence *in situ* hybridization of *Rhodopseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 205-213
- Oliveira, K., G.W. Procop, D. Wilson, J. Coull and H. Stender 2002: Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 40: 247-251
- Oliver, A., R. Cantón, P. Campo, F. Baquero and J. Blázquez 2000: High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1253

Oliver, J.D. 1993: Formation of viable but nonculturable cells. P. 239-272, in S. Kjelleberg (ed.) Starvation in bacteria. Plenum Press, New York.

Olivier, K.N., D.J. Weber, R.J. Wallace Jr., A.R. Faiz, J.-H. Lee, Y. Zhang, B.A. Brown-Elliott, A. Handler, R.W. Wilson, M.S. Schechter, L.J. Edwards, S. Chakraborti and M.R. Knowles 2003a: Nontuberculous mycobacteria. I: Multicentre prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167(6): 828-834

Olivier, K.N., D.J. Weber, J.H. Lee, A. Handler, G. Tudor, P.L. Molina, J. Tomashefski and M.R. Knowles 2003b: Nontuberculous mycobacteria. II: nested cohort-study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167(6): 810-12

Palleroni, N.J. and J.F. Bradbury 1993: *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 43(3):606-609

Patchett, R. A., J. P. Back, A. C. Pinder and R. G. Kroll. 1991: Enumeration of bacteria in pure cultures and in foods using a commercial flow cytometer. *Food Microbiol.* 8:119–126.

Pedersen, N.T., N. Hoiby, C.H. Mordhorst, K. Lind, E.W. Flensburg and B. Bruun 1981: Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, *Chlamydia* and *Mycoplasma*: Possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Paediatr Scan* 70: 623-628

Pernthaler, A., J. Pernthaler, M. Schattenhofer and R. Amann: Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal North Sea plankton. *Appl Environ Microbiol* 68: 5738-5736

Perry-O'Keefe, H., S. Rigby, K. Oliveira, D. Sorensen, H. Stender, J. Coull and J.J. Hyldig-Nielsen 2001: Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *J Microbiol Methods* 47: 218-292

Pier, G.B., M. Grout and T.S. Zaidi 1997: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12088-12093

Pier, G.B. 2000: Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8822-8828

Pier, G.B., F. Coleman, M. Grout, M. Franklin and D.E. Ohman 2001: Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* 69: 1895-1901

Pierre-Audigier, C., A. Ferroni, I. Sermet-Gaudelus, M. Le Bourgeois, C. Offredo, H. Vu-Thien, B. Fauroux, P. Mariani, A. Munck, E. Bingen, D. Guillemot, G. Quesne, V. Vincent, P. Berche and J.-L. Gaillard 2005: Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 43(7): 3467-3470

Pinkel, D., J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas and J. Gray 1988: Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9138-9142

Poppert, S., A. Essig, R. Marre, M. Wagner and M. Horn 2002: Detection and differentiation of *Chlamydiae* by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 68: 4081–4089

Poppert, S., A. Essig, B. Stoehr, A. Steingruber, B. Wirths, S. Juretschko, U. Reischl, and N. Wellinghausen 2005: Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 43: 3390–3397

Postgate, J. R. 1976: Death in microbes and macrobes, p. 1-19. In T.R.G. Gray and J.R. Postgate (ed.) *The survival of vegetative microbes*; Cambridge University Press

Poulsen, L.K., G. Ballard and D.A. Stahl 1993: Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol* 59: 1354-1360

Prober, C.G. 1991: The impact of respiratory viral infections in patients with cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy* 9: 87-102

Ramsey, B.W. 1996: Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 335: 179-188

Reik, R., T. Spilker and J.J. LiPuma 2005: Distribution of *Burkholderia cepacia* Complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 43 (6): 2926-2928

Rogers, G.B., C.A. Hart, J.R. Mason, M. Hughes, M.J. Walshaw and K.D. Bruce 2003: Bacterial diversity in cases of lung infection in cystic fibrosis patients: 16S ribosomal DNA (rDNA) length heterogeneity PCR and 16S rDNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 41: 3548-3558

Rogers, G.B., M.P. Carroll, D.J. Serisier, P.M. Hockey, G. Jones and K.D. Bruce 2004: Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 42(11): 5176-5183

Rogers, G.B., M.P. Carroll, D.J. Serisier, P.M. Hockey, V. Kehagia, G.R. Jones and K.D. Bruce 2005: Bacterial activity in cystic fibrosis lung infections. *Respir Res* 6:49

Rommens, J.M., M.C. Ianuzzi, B. Kerem, M.C. Drumm, S. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.C. Cole, J.R. Kennedy, N. Hakida, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.C. Tsui and F.S. Collins 1989: Identification of the CF-gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065

Rosenfeld, M., J. Emerson, F. Accurso, D. Armstrong, R. Castile, K. Grimwood, P. Hiatt, K. McCoy, S. McNamara, B. Ramsey and J. Wagener 1999: Diagnostic

accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 28: 321-328

Rosenstein, B.J. 2002: Cystic fibrosis diagnosis: new dilemmas for an old disorder. *Pediatr Pulmonol* 33: 83-84

Rowe, S.J., N.J. Messenger and A.E. Warner 1993: The role of noradrenalin in the differentiation of amphibian embryonic neurons. *Development* 119: 1343-1357

Rubenstein, R.C. 2005: Novel, mechanism-based therapies for cystic fibrosis. *Curr Opin Pediatr* 17(3): 385-392

Rubin, B.K. 2007: Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 8(1): 4-7

Rüssmann, H., V.A.J. Kempf, S. Koletzko, J. Heesemann and I. Autenrieth 2001a: Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimen. *J Clin Microbiol* 39 (1): 304-308

Rüssmann, H., K. Adler, R. Haas, B. Gebert, S. Koletzko and J. Heesemann 2001b: Rapid and accurate determination of genotypic Clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 39: 4142-4144

Sahar, E., R. Lamed and I. Ofek 1983: Rapid identification of *Streptococcus pyogenes* by flow cytometry. *Eur J Microbiol* 2(3): 192-195

Saini, L.S., S.B. Galsworthy, M.A. John and M.A. Valvano 1999: Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation. *Microbiology* 145: 3465-3475

Sajjan, U., M. Corey, A. Humar, E. Tullis, E. Cutz, C. Ackerley and J. Forstner 2001: Immunolocalisation of *Burkholderia cepacia* in the lungs of cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 50: 535-546

Sambrook, J., E.F. Fritsch T. and Maniatis 1989: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Sato, E., H. Hattori and Y. Kanaoka 1991: Fluorogenic Bimane Substrates with Dabsyl Group for Endopeptidases; Chymotrypsin, Collagenase and Thermolysin; *J. Pharmacobio-Dyn* 14: 599-604

Shak, S., D.J. Capon, R. Hellmiss, S.A. Marsters and C. L. Baker 1990: Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Nati Acad Sci USA* 87: 9188-9192

Sheppard, D.N. and M.J. Welsh 1999: Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol Rev* 79;1: S23-S45

- Simon, N., N. LeBot, D. Marie, F. Parentsky and D. Vaultot 1995: Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 61: 2506-2513
- Sincock, S. A., and J. P. Robinson 2001: Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods Cell Biol.* 64:511–537.
- Singh, P.K., H.P. Jia, K. Wiles et al. 1998: Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14961-14966
- Smalley, J.W., P.Charalabous, A.J. Birrs and C.A. Hart 2001: Detection of heme binding proteins in epidemic strains of *Burkholderia cepacia*. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 509-514
- Søgaard, M., H. Stender and H. C. Schønheyder 2005: Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence *in situ* hybridization assays using peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 43: 1947–1949
- Sorensen, A.H., V.L. Torsvik, T. Torsvik, L.K. Poulsen and B.K. Ahring 1997: Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 63(8): 3043-3050
- Speert, D.P. and M.E Campbell 1987: Hospital epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Hosp Infect* 9: 11-21
- Spring, S., R. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, H. Gemerden and K. Petersen 1993: Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment. *Appl Environ Microbiol* 59: 2397-2403
- Sriramulu, D.D., H. Lünsdorf, J.S. Lam and U. Römling 2005 : Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol.* 54(Pt 7):667-76
- Steen, H.B. and T. Lindmo 1979: Flow cytometry: a high resolution instrument for everyone. *Science* 204: 403-404
- Stender, H., K. Lund, K.H. Petersen, O.F. Rasmussen, P. Hongmanee, H. Miørner and S.E. Godtfredsen 1999: Fluorescence *in situ* hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. *J Clin Microbiol* 37 (9): 2760-2765
- Stender, H., M. Fiandaca, J.J. Hyldig-Nielsen and J. Coull 2002: PNA for rapid microbiology. *J Microbiol Methods* 48: 1-17
- Stern, R.C. 1997: The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 336:487-491
- Stutts, M.J., M.R. Knowles, J.T. Gatzky and R.C. Boucher 1986: Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr Res* 20(12): 1316-1320

Takaku, H., S. Kodaira, A. Kimoto, M. Nashimoto and M. Takagi 2006: Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and –independent approaches. *J biosci Bioeng* 101(1): 42-50

Tan, W., X. Fang, J. Li and X. Liu 2000: Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies; *Chem. Eur. J.* 6: 1107-1111

Terry, J.M., S.E. Pina and S.J. Mattingly 1991: Environmental conditions which influence mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 59: 471-477

Thomas, J.-C., M. Desrosiers, Y. St-Pierre, P. Lirette, J.-G. Bisailon, R. Beaudet and R. Villemur 1997: Quantitative flow cytometric detection of specific microorganisms in soil samples using rRNA targeted fluorescent probes and ethidium bromide. *Cytometry* 27: 224-232

Tomkiewicz, R.P., E.M. App, J.G. Zayas, O. Ramirez, N. Church, R.C. Boucher, M.R. Knowles and M. King 1993: Amiloride inhalation therapy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 148: 1002-1007

Trebesius, K. 1995: Entwicklung und Anwendung sensitiver *in situ* Techniken zum Nachweis ribosomaler RNS in ganzen bakteriellen Zellen. Doktorarbeit, Technische Universität München

Trebesius, K., L. Leitritz, K. Adler, S. Schubert, I.B. Autenrieth and J. Heesemann 2000: Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. *Med Microbiol Immunol* 188: 169-175

Treharne, K.J., R.M. Crawford and A. Mehta 2006: CFTR, chloride concentration and cell volume: could mammalian protein histidine phosphorylation play a latent role? *Exp Physiol* 91 (1): 131-139

Trivier, D., N. Houdret, R.J. Courcol, G. Lamblin, P. Roussel and M. Davril 1997: The binding of surface proteins from *Staphylococcus aureus* to human bronchial mucus. *Eur Respir J* 10: 804-810

Tsui, L.C., M. Buchwald, D. Barker, R.G. Knowlton, J.W. Schumm, H. Eibers, J. Mohr, D. Kennedy, N. Plavcic, M. Zsisa, D. Markiewicz, G. Askots, V.A. Brown, C. Helms, T. Gravis, C. Parker, K. Rediker, H. Donis-Keller 1985: Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA-marker. *Science* 230: 1054-57

Tyagi, S. and F.R. Kramer 1996: Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14: 303-308

Tyagi, S., D.P. Bratu and F.R. Kramer 1998: Multicolor molecular beacon for allele discrimination. *Nature Biotechnology* 16: 49-53

Ulrich, M., S. Herbert, J. Berger, G. Bellon, D. Louis, G. Munker and G. Döring 1998: Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic

fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. Am J Respir Cell Mol Biol 19: 83-91

Valdezate, S., A.Vindel, L.Maiz, F.Baquero, H.Escobar and R.Canton 2001: Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. Emerg Infect Dis. 7(1):113-122

Vandamme, P., B. Holmes, M. Vancanniet, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, R. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, M. Kersters and J.R.W. Govan 1997: Occurance of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrisis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 47(4):1188-1200

van der Waaij, L.A., G.Mesander, P.C. Limburg and D. Vanderwaaij 1994: Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. Cytometry 16: 270-279

Waar, K., J.E. Degener, M.J. van Luyn and H.J. Harmsen 2005: Fluorescent *in situ* hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. J Med Microbiol 54: 937-944

Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer and K.H. Schleifer 1993: Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl Environ Microbiol 59: 1520-1525

Wagner, M. 1995: Die Anwendung von *in situ* Hybridisierungssonden zur Aufklärung mikrobieller Populationsstrukturen in der Abwasserreinigung. Doktorarbeit, Technische Universität München

Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops and K.-H. Schleifer 1995: In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. Syst Appl Microbiol 18: 251-264

Wagner, M., M. Horn and H. Daims 2003: Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. Curr Opin Microbiol 6(3):302-309

Wallner, G., R. Amann and W. Beisker 1993: Optimizing fluorescent in situ hybridisation of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry 14: 136-143

Wallner, G., R. Erhart and R. Amann 1995: Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. Appl Environ Microbiol 61: 1859-1866

Wallner, G., B. Fuchs, S. Spring, W. Beisker and R. Amann 1997: Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. Appl Environ Microbiol 63: 4223-4231

Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.E.G. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr and H.G. Trüper 1987: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int J Syst Bacteriol 37: 463-464

Weichert, D. and S. Kjelleberg 1996: Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. Microbiology 142: 845-853

Weidner, S., W. Arnold and A. Puhler 1996: Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl Environ Microbiol 62(3) 766-771

Weise, A., T. Liehr, U. Claussen and K.J. Halbhuber 2005: Increased efficiency of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) using the microwave. J Histochem Cytochem 53(10): 1301-1303

Whiteford, M.L., J.D. Wilkinson, J.H. McColl, F.M. Conlon, J.R. Michie, T.J. Evans and J.Y. Paton 1995: Outcome of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. Thorax 50: 1194-1198

Wilkins, L., H. Gerr, D. Gadzicki, H. Kreipe and B. Schlegelberger 2005: Standardised fluorescence *in situ* hybridisation in cytological and histological specimens. Virchows Arch 447(3): 586-592

Williams, I., F. Paul, D. Lloyd, R. Jepras, I. Critchley, M. Newman, J. Warrack, T. Giokarini, A. J. Hayes, P. F. Randerson and W. A. Venables 1999: Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. Microbiology 145: 1325–1333

Willis, E., R. Miller and J. Wyn 2001: Gendered embodiment and survival for young people with cystic fibrosis. Soc Sci Med 53: 1163-1174

Wilmott, R.W: 1985: Allergy and infection in cystic fibrosis. In: A.D. Millner and R.J. Martin (eds): Neonatal and paediatric respiratory medicine. London, Butterworths; chap 10, pp 190-210

Wilson, A.C., S.S. Carbon and T.J. White 1977: Biochemical evolution. Annu Rev Biochem 46: 473-521

Woese, C.R. 1987: Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271

Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K.C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J.R. Yankaskas, S. Randell, R.C. Boucher and G. Döring 2002: Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest 109(3): 317-325

Worlitzsch, D., M. Knoll, M. Dürr und M. Borneff-Lipp 2006: Mikrobiologische Pathomechanismen der *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion bei Patienten mit Cystischer Fibrose. Hyg Med 31(4): 161-168

Wu, Z. and W.G. Tong 1998: Absorbance detection of amino acids by laser wave mixing in microbore liquid chromatography; Journal of Chromatography A 805: 63-69

Wu, J.A., C. Kusuma, J. J. Mond and J. F. Kokai-Kun 2003: Lysostaphin Disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 47(11): 3407-3414

Xi, C., M. Balberg, S.A. Boppard and L. Raskin 2003: Use of peptide nucleic acid molecular beacons for detection and quantification of rRNA in solution and in whole cells. *Appl Environ Microbiol* 69(9): 5673-5678

Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakawa 1992: Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb nov. *Microbiol Immunol* 36: 1251-1275

Yoon, S.S., R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gerdner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P. Mason, D.J. Wozniak, R.E. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, R.C. Boucher and D.J. Hassett 2002: *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationship to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 3(4): 593-603

Zaman, G.J.R., P.J.A. Michiels and C.A.A. van Boeckel 2003: Targeting RNA: new opportunities to address drugless targets. *Drug Discov Today* 8 (7): 297-306

Zar, H., L. Saiman, L. Quittell and A. Prince 1995: Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J Pediatr* 126(2): 230-233

Zhu, X.Y.; J. Lubeck and J.J. Kilbane 2nd 2003: Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Appl Environ Microbiol* 69(9): 5354-5363

Zielenski, J. and L.-C. Tsui 1995: Cystic Fibrosis: Genotypic and Phenotypic Variations. *Annual Rev of Genet* 29: 777-807

Zielenski, J. 2000: Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 117-133

Zoetendal, E.G., K. Ben-Amor, H.J.M. Harmsen, F. Schut, A.D.L. Akkermans and W.M. de Vos 2002: Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* 68: 4225-4232

Zuckermandl, E. and L. Pauling 1965: Molecules as documents of evolutionary history. *J Theoret Biol* 8: 357-366

Zughaier, S.M., H.C. Ryley and S.K. Jackson 1999: A melanin pigment purified from an epidemic strain of *Burkholderia cepacia* attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. *Infect Immun* 67: 908-913

6.3 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann bedanken für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu dürfen, für die Bereitstellung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Hogardt für seine stetige und konstruktive Betreuung dieser Arbeit.

Ganz, ganz herzlichen Dank auch an alle MitarbeiterInnen des CF-Labors für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, ganz besonders meinen Eltern, die mich zu dem werden ließen, was ich heute bin.

Vielen Dank an alle meine FreundInnen inner- und außerhalb der Medizin für konstruktive Gespräche, Aufmunterung und einfach „Da-Sein“. Besondere Erwähnung verdienen hier Daniela für orthographische sowie Nicola, Uwe und Dieter für technische Hilfestellungen.

Vor allem danke ich Michl für seine ausdauernde Unterstützung und Motivierung, ohne die diese Arbeit vielleicht nicht fertiggestellt worden wäre.

Dem Andenken meiner Omi gewidmet (1919 – 2007).

6.4 Lebenslauf

Name: Cordula Elvira Grzonka
Geburtsdatum: 18. Januar 1974
Geburtsort: Düsseldorf
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1980-1984 Kath. Grundschule Unter den Eichen, Düsseldorf
1984-1993 Städt. Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf
1993 Abitur

Studium

04/1995 – 03/1997 vorklinisches Studium an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
03/1997 Ärztliche Vorprüfung
10/1997 – 08/1998 1. Klinischer Studienabschnitt an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
08/1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998 – 08/2001 2. Klinischer Studienabschnitt an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 – 09/2002 Praktisches Jahr
an der HNO-Klinik des Klinikums Großhadern,
in der chirurgischen Abteilung des Klinikums Traunstein,
in der kinderchirurgischen Abteilung des Sheffield
Children's Hospital, GB,
und in der internistischen Abteilung des Klinikums
Traunstein
10/2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

seit 8/1999 bei Prof. Dr. Dr. J. Heesemann am Max-von-Pettenkofer-Institut, München: „Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zum Nachweis bakterieller Erreger bei Mukoviszidose“

Beruflicher Werdegang

04/2003 – 09/2004 „Arzt im Praktikum“ an folgenden Krankenhäusern:
Marien-Hospital Düsseldorf
Kettering General Hospital, GB
Leicester Royal Infirmary, GB
in folgenden Fachbereichen:
Innere Medizin, Allgemeinchirurgie, HNO

11/2004 Approbation

Seit 02/2005 chirurgische Weiterbildung am Kettering General Hospital, Kettering, Northamptonshire, GB, sowie dem Kent & Sussex Hospital, Tunbridge Wells, Kent, GB

Nicht-ärztliche Berufserfahrung

1993/94 sechsmonatiges Krankenpflegepraktikum im Krankenhaus Marienhof, Koblenz;

1994/95 siebenmonatiges Praktikum in der Betreuung körperlich Schwerbehinderter in Cheltenham, GB

1995 – 1998 Beiwache in der Ludolph-Krehl-Klinik, Heidelberg

1997 fünfmonatige Arbeit in einem Entwicklungsprojekt und Sprachkurs in Guatemala, Mittelamerika

1999 Stationsaushilfe in der Klinik Dr. Müller, München

1999 – 2000 Tätigkeit im Pflegeverein Senora, München

2001 – 2002 studentische Hilfskraft in der Qualitätssicherung am Diabeteszentrum des Klinikums Innenstadt, München

